

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

El factor de transcripción Tbx20 regula selectivamente la expresión de los canales cardiacos hERG y la densidad de la IKr. Posible implicación del gen TBX20 en el síndrome de QT largo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Raquel García Utrilla

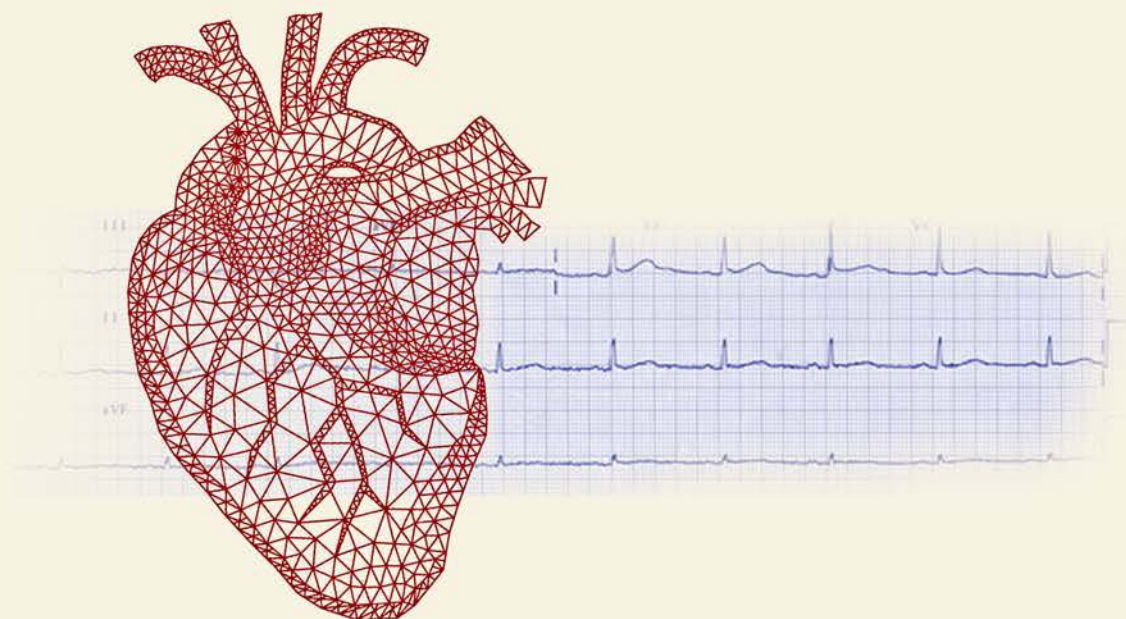
Directores

**Eva Delpón Mosquera
Ricardo Caballero Collado
Juan Tamargo Menéndez**

Madrid



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA



EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN *Tbx20* REGULA
SELECTIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE LOS CANALES
CARDIACOS *hERG* Y LA DENSIDAD DE LA I_{Kr} .
POSIBLE IMPLICACIÓN DEL GEN *TBX20* EN EL
SÍNDROME DE QT LARGO

TESIS DOCTORAL
Raquel García Utrilla

DIRECTORES
Dra. Eva Delpón Mosquera
Dr. Ricardo Caballero Collado
Dr. Juan Tamargo Menéndez

Madrid, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. RAQUEL GARCIA UTRILLA,
estudiante en el Programa de Doctorado INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA,
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

El factor de transcripción Tbx20 regula selectivamente la expresión de los canales cardíacos hERG
y la densidad de la IKr. Posible implicación del gen TBX20 en el Síndrome de QT largo.

y dirigida por: MARIA EVA DELPÓN MOSQUERA

RICARDO CABALLERO COLLADO

JUAN TAMARGO MENÉNDEZ

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 15 de julio de 2019

Fdo.: RAQUEL GARCIA UTRILLA

ÍNDICE

I. RESUMEN/SUMMARY	1
Resumen	3
Summary	9
II. INTRODUCCIÓN	13
1. Electrofisiología cardíaca.....	15
1.1. Excitabilidad	16
1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular	18
1.1.2. El potencial de reposo	19
1.1.3. El potencial de acción	19
1.1.3.a. PA rápidos o dependientes de Na^+	21
1.1.3.b. PA lentos o dependientes de Ca^{2+}	23
1.2. Automatismo	23
1.3. Refractoriedad	24
1.4. Propagación del impulso cardíaco.....	25
2. Canales iónicos implicados en el potencial de acción cardíaco	27
2.1. Canales de Na^+	27
2.1.1. Estructura de los canales de Na^+	27
2.1.2. Características de la I_{Na}	29
2.2. Canales de Ca^{2+}	31
2.2.1. Estructura de los canales de Ca^{2+}	32
2.2.2. Características de la $I_{\text{Ca,L}}$	34
2.3. Canales de K^+	35
2.3.1. Canales 2TM/IP	36
2.3.1.a. Mecanismo de rectificación interna en los canales Kir	37
2.3.1.b. Estructura de los canales Kir.....	39
2.3.1.c. Principales corrientes cardíacas generadas a través de los canales Kir.....	41
I. La I_{K1}	41

I.a. Composición de los canales que generan la I_{K1}	42
II. La $I_{K,ATP}$	43
III. La $I_{K,ACh}$	45
2.3.2. Canales 6TM/1P.....	45
2.3.2.a. Estructura de los canales Kv.....	46
I. La subunidad α	48
Dominio del poro y filtro de selectividad.....	49
Sensor de voltaje.....	51
II. Subunidades auxiliares.....	52
2.3.2.b. La inactivación de los canales Kv.....	53
2.3.2.c. Principales corrientes generadas a través de los canales Kv que intervienen en el PA cardiaco.....	55
I. La I_{to}	56
II. La I_{Kur}	57
III. La I_{Kr}	58
III.a. Composición de los canales que generan la I_{Kr}	59
Subunidad α	59
Subunidad β	66
III.b. Características de la I_{Kr}	67
III.c. Regulación de la I_{Kr}	71
Regulación de la I_{Kr} por factores intrínsecos.....	71
Regulación de la I_{Kr} por factores extrínsecos.....	72
- Regulación de la I_{Kr} por cambios en la composición del medio extracelular.....	73
- Regulación de la I_{Kr} por estimulación β -adrenérgica.....	73
- Regulación de la I_{Kr} en condiciones patológicas.....	77
III.d. Propiedades farmacológicas de la I_{Kr}	78
IV. La I_{Ks}	80
3. Síndromes cardiacos arritmogénicos primarios.....	81
3.1. Síndrome QT Largo congénito.....	85
3.1.1. Características principales y manifestaciones clínicas.....	85
3.1.2. Diagnóstico de SQTLC.....	88
3.1.3. Características genotípicas del SQTLC.....	94

3.1.3.a. SQTLC asociado a corrientes de K^+	94
3.1.3.b. SQTLC asociado a la corriente de Na^+	96
3.1.3.c. SQTLC asociado a la corriente de Ca^{2+}	96
3.1.3.d. Otros tipos de SQTLC.....	97
3.1.4. Pronóstico del SQTLC.....	98
3.1.5. Tratamiento del SQTLC.....	100
3.1.5.a. Prevención de los síntomas.....	103
3.2. Síndrome QT Largo adquirido.....	104
3.3. Síndrome QT Largo tipo 2.....	107
3.3.1. Tratamiento del SQTLC.....	111
4. Factor de transcripción Tbx20.....	114
4.1. Características principales de la familia de factores T-box.....	114
4.2. Interacción entre el ADN y los factores T-box.....	115
4.3. Características principales de Tbx20.....	117
4.4. Interacción entre el ADN y Tbx20.....	120
4.5. Cardiopatías congénitas asociadas a Tbx20.....	124
III. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	127
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	131
1. Evaluación clínica de los pacientes.....	133
1.1. Preparación de las muestras.....	133
1.2. Secuenciación de las muestras.....	134
1.3. Análisis bioinformático de las variantes.....	136
1.4. Secuenciación mediante el método de Sanger.....	137
2. Técnica de fijación de voltaje en parche de membrana (<i>patch-clamp</i>).....	138
3. Obtención de vectores y mutagénesis dirigida.....	141
4. Registro de la I_{hERG} e I_{SK3} en sistemas de expresión heterólogos.....	142
4.1. Cultivo y transfección de los canales hERG y SK3 en células CHO	142
4.2. Técnicas de registro en sistemas de expresión heterólogos	144
4.3. Registro de la I_{hERG} e I_{SK3} : Soluciones y protocolos experimentales	145

5. Registro de I_{Kr}, I_{Ks}, I_{Na}, $I_{Ca,L}$ (I_{Ba}), e I_f en células HL-1.....	146
5.1. Cultivo y transfección de las células HL-1.....	146
5.2. Silenciamiento de Tbx20 en células HL-1.....	147
5.3. Técnicas de registro en células HL-1.....	148
5.4. Registro de I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Na} , $I_{Ca,L}$ (I_{Ba}), e I_f en células HL-1: Soluciones y protocolos experimentales.....	148
6. Registro de I_{K1} en miocitos ventriculares de rata adulta	153
6.1. Disociación enzimática de miocitos ventriculares de rata	153
6.2. Cultivo e infección de miocitos ventriculares de rata.....	153
6.3. Técnicas de registro en miocitos ventriculares de rata	154
6.4. Registro de la I_{K1} ventricular de rata: Soluciones y protocolos experimentales	154
7. Registro de I_{Kr}, $I_{Ca,L}$ y PAs en cardiomiocitos ventriculares derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC-CMs).....	155
7.1. Obtención de los cardiomiocitos ventriculares derivados de hiPSC.....	155
7.2. Diferenciación, cultivo e infección de hiPSC-CMs.....	155
7.3. Técnicas de registro en hiPSC-CMs.	156
7.4. Registro de I_{Kr} , $I_{Ca,L}$ y PAs en hiPSC-CMs: Soluciones y protocolos experimentales.....	156
8. Experimentos de <i>Western blot</i> (WB).....	158
8.1. Extracción proteica en células HL-1 transfectadas y/o infectadas.....	158
8.2. Cuantificación de proteínas.....	158
8.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida, transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección.....	159
8.4. Anticuerpos empleados.....	160
9. Ensayo de detección de la actividad luciferasa.....	160
9.1. Detección de la actividad luciferasa en células HL-1.....	160
10. Modelo matemático del PA ventricular humano.....	161
11. Análisis estadístico de los resultados.....	161
V. RESULTADOS.....	163
1. Antecedentes clínicos.....	165

2. Identificación y análisis genético de las variantes	168
3. Análisis funcional de la mutación hERG p.T152HfsX180.....	175
3.1. Características electrofisiológicas de la I_{hERG} generada en células CHO.....	175
3.2. Características electrofisiológicas de la I_{Kr} generada en células HL-1.....	179
3.3. Efecto de la mutación hERG p.T152HfsX180 sobre las características del PA ventricular humano.....	182
4. Análisis funcional de la mutación Tbx20 p.R311C.....	184
4.1. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la I_{Kr} generada en células HL-1. Estudio electrofisiológico.....	186
4.2. Efecto de Tbx20 sobre los niveles de expresión de los canales hERG en células HL-1. Ensayo de WB.....	189
4.3. Efecto del silenciamiento de Tbx20 sobre la I_{Kr} generada en células HL-1.....	192
4.4. Efecto de Tbx20 sobre el gen <i>KCNH2</i> humano en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa.....	195
4.5. Efecto de la mutación Tbx20 p.R311C sobre las características del PA ventricular humano.....	197
4.6. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la I_{Kr} y PAs generados en hiPSC-CMs.....	200
5. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre otros canales iónicos cardiacos.....	204
5.1. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la I_{Ks}	204
5.1.1. Efecto de Tbx20 sobre la I_{Ks} generada en células HL-1. Estudio electrofisiológico.....	205
5.1.2. Efecto de Tbx20 sobre los niveles de expresión de los canales Kv7.1 en células HL-1. Ensayo de WB.....	207
5.1.3. Efecto de Tbx20 sobre la transcripción de los genes <i>KCNQ1</i> y <i>KCNE1</i> humanos en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa.....	209
5.2. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la I_{K1}	211
5.2.1. Estudio electrofisiológico en células HL-1.....	211
5.2.2. Efecto de Tbx20 sobre la I_{K1} generada en miocitos ventriculares de rata adulta. Estudio electrofisiológico.....	212
5.2.3. Efecto de Tbx20 sobre los niveles de expresión de los canales Kir2.1 en células HL-1. Ensayo de WB.....	213
5.3. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la I_{Na}	214

5.3.1. Efecto de Tbx20 sobre la I_{Na} generada en células HL-1. Estudio electrofisiológico.....	215
5.3.2. Efecto de Tbx20 sobre la transcripción de los genes <i>SCN5A</i> y <i>SCN2B</i> humanos en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa.....	219
5.4. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la $I_{Ca,L}$.....	220
5.4.1. Efecto de Tbx20 sobre la $I_{Ca,L}$ generada en células HL-1. Estudio electrofisiológico.....	220
5.4.2. Efecto de Tbx20 sobre los niveles de expresión de los canales Cav1.2 en células HL-1. Ensayo de WB.....	223
5.4.3. Efecto de Tbx20 sobre la $I_{Ca,L}$ generada en hiPSC-CMs. Estudio electrofisiológico.....	224
5.4.4. Efecto de Tbx20 sobre la transcripción del gen <i>CACNA1C</i> humano en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa.....	225
6. Análisis funcional de la variante c.-66A>G en el gen <i>KCNN3</i>.....	226
6.1. Características electrofisiológicas de la corriente generada por los canales SK3 en células CHO.....	227
6.2. Efecto de Tbx20 sobre transcripción del gen <i>KCNN3</i> en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa.....	228
VI. DISCUSIÓN.....	231
1. Análisis funcional de la mutación hERG p.T152HfsX180.....	233
1.1. La mutación p.T152HfsX180 en los canales hERG, por sí sola, no es responsable del desarrollo de SQT.....	236
2. Análisis funcional de la mutación Tbx20 p.R311C.....	239
2.1. Tbx20 WT, pero no Tbx20 p.R311C, regula los niveles de expresión del gen <i>KCNH2</i> en el miocardio adulto humano.....	
2.2. La $\alpha 1$ -sintrofina interacciona con los canales Kir2.1-2.2, pero no con Kir2.3	240
3. Análisis funcional de la variante c.-66A>G en el gen <i>KCNN3</i>.....	244
3.1. La mutación c.-66A>G en la región promotora del gen <i>KCNN3</i> no es responsable del desarrollo de SQT.....	245

4. Implicaciones clínicas	246
4.1. La presencia conjunta de las mutaciones p.T152HfsX180 en los canales hERG y p.R311C en el factor Tbx20 favorece el desarrollo de SQT.....	247
5. Limitaciones del estudio.....	248
VII. CONCLUSIONES.....	249
VIII. ABREVIATURAS.....	253
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	259
X. PUBLICACIONES.....	293

I. Resumen/Summary

RESUMEN

EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Tbx20 REGULA SELECTIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE LOS CANALES CARDIACOS hERG Y LA DENSIDAD DE LA I_{Kr} . POSIBLE IMPLICACIÓN DEL GEN *TBX20* EN EL SÍNDROME DE QT LARGO

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El Síndrome QT Largo (SQTl) es un síndrome arritmogénico primario hereditario que comprende un grupo de trastornos de la repolarización cardíaca caracterizados por una prolongación excesiva y heterogénea del potencial de acción (PA) lo que se manifiesta en el electrocardiograma como una prolongación del intervalo QT. Por lo general, las manifestaciones clínicas ocurren en niños y adultos jóvenes con corazones estructuralmente normales y se asocian al desarrollo de arritmias ventriculares que pueden progresar a taquicardia ventricular polimórfica (TV) conocida como *torsade de pointes* (TdP), fibrilación ventricular y muerte súbita cardíaca (MSC).

El SQTl presenta una penetrancia baja y una amplia variabilidad fenotípica entre aquellos miembros de familias que portan una misma mutación, lo cual puede ser parcialmente atribuido a la presencia de modificadores genéticos adicionales. Actualmente se han identificado hasta 17 genes asociados con formas autosómicas dominantes de SQTl. De todas ellas, las más frecuentes (75-90% de los casos) son el SQTl tipo 1 (SQTl1), tipo 2 (SQTl2) y tipo 3 (SQTl3), asociados a mutaciones en los genes *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*, respectivamente.

El gen *KCNH2* codifica la subunidad α de los canales Kv11.1 o hERG (*human ether-à-go-go related gene*) responsables de generar el componente rápido de la corriente de salida de K^+ con rectificación tardía (I_{Kr}) en el miocardio humano. Dicha corriente determina la repolarización durante la fase 3 del PA y juega un papel crítico en el control de la duración del PA (DPA) y del periodo refractario cardíacos. Se han identificado hasta 500 mutaciones diferentes en el gen *KCNH2* que dan lugar a la pérdida de función del canal y están asociadas al SQTl2.

El gen *TBX20* codifica el factor de transcripción Tbx20 perteneciente a la familia de factores T-box implicados en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario. En el hombre, como en el resto de vertebrados, Tbx20 juega un papel muy importante en la cardiogénesis. Diversos estudios han asociado la presencia de mutaciones en el gen *TBX20* con la aparición de diferentes tipos de malformaciones congénitas cardíacas, incluyendo anomalías en el septo interauricular e interventricular, de la válvula mitral, foramen oval permeable (FOP), tetralogía de

Fallot, defectos del septo auriculoventricular y cardiomiopatía dilatada (CMD). En organismos menos evolucionados como el ratón o las moscas del género *Drosophila*, la expresión de Tbx20 no se encuentra restringida sólo a la etapa embrionaria, sino que también regula la homeostasis cardíaca en la etapa adulta. Sin embargo, actualmente se desconoce si en el miocardio adulto humano ocurre de igual manera.

En colaboración con la Unidad de Arritmias del Hospital la Paz y en el contexto del consorcio ITACA (Investigación Traslacional de Arritmias Cardíacas hereditarias) se identificó a un varón (caso índice) perteneciente a una familia española de origen africano que había sufrido un síncope y había sido diagnosticado de SQT tipo 2. Cuatro mujeres de la familia habían sufrido MSC, dos de las cuales fallecieron siendo muy jóvenes. La variabilidad en la penetrancia y expresividad del SQT en dicha familia hacía suponer que los condicionantes genéticos subyacentes eran muy complejos. Por tanto, el **OBJETIVO PRINCIPAL** de la presente **TESIS DOCTORAL** es analizar funcionalmente la o las mutaciones de las que eran portadores el caso índice y los familiares afectados así como identificar el mecanismo electrofisiológico celular responsable en el desarrollo de SQT en la familia.

RESULTADOS

El genotipado mediante técnicas de secuenciación masiva de última generación del caso índice permitió identificar tres mutaciones en los genes *KCNH2*, *TBX20* y *KCNN3*. Las dos primeras codificaban los canales hERG p.T152HfsX180 y el factor de transcripción Tbx20 p.R311C, respectivamente. La mutación c.-66A>G afectaba a la región promotora del gen *KCNN3*.

El análisis electrofisiológico de los canales hERG p.T152HfsX180 expresados en células de ovario de hámster chino (CHO) demostró que los canales mutados *per se* no generaban corriente. Este resultado era coherente con el hecho de que los canales p.T152HfsX180 son un péptido de 332 aminoácidos de los que sólo 152 coinciden con los de la proteína nativa (WT) de 1159 aminoácidos. Sin embargo, sorprendentemente, dicho péptido es capaz de ejercer un *efecto chaperona* sobre canales hERG WT, aumentando la expresión de éstos en la membrana así como la corriente generada tanto en células CHO como HL-1 (I_{hERG} e I_{Kr} , respectivamente). De hecho, la co-transfección de canales hERG WT + hERG p.T152HfsX180 genera una corriente cuya densidad, cinética y características dependientes de voltaje son indistinguibles de las de la corriente generada por los canales hERG WT solos. Como consecuencia, la presencia de la mutación no altera la duración de los PAs como se pudo demostrar mediante un modelo matemático del PA ventricular humano.

El efecto de Tbx20, tanto WT como p.R311C, sobre la expresión de los diferentes genes que codifican los canales iónicos cardiacos fue analizado mediante los correspondientes estudios electrofisiológicos en células HL-1, miocitos ventriculares de rata adulta, y en hiPSC-CMs, así como en experimentos de *western blot* (WB) y de detección de actividad luciferasa. Los resultados obtenidos demuestran que Tbx20 WT ejerce un efecto pro-transcripcional sobre el gen *KCNH2*, aumentando la expresión de los canales hERG y la densidad de la I_{Kr} generada por éstos. Por el contrario, Tbx20 p.R311C se une al promotor mínimo humano del gen *KCNH2* pero carece por completo de actividad pro-transcripcional. Por consiguiente, su presencia da lugar a una disminución en la expresión de los canales hERG y de la I_{Kr} . Esta disminución de la I_{Kr} es responsable de la prolongación significativa de la duración de los PAs registrados tanto en hiPSC-CMs como de los simulados a partir del modelo matemático del PA ventricular humano. Ninguna de las formas de Tbx20 (ni WT ni mutado) es capaz de regular la expresión de los canales iónicos que generan la I_{Ks} , I_f e I_{Na} en células HL-1, la I_{K1} en miocitos ventriculares de rata o la $I_{Ca,L}$ en hiPSC-CMs.

El gen *KCNN3* codifica los canales de potasio de baja conductancia activados por Ca^{2+} tipo 3 (SK3). A pesar de que estos canales se han localizado tanto en el tejido auricular como ventricular su papel en condiciones fisiológicas es desconocido, habiéndose propuesto que su expresión aumentaría en pacientes con fibrilación auricular crónica. El análisis funcional de la mutación c.-66A>G en el promotor del gen *KCNN3* mediante la detección de la actividad luciferasa en células HL-1, demostró que dicha variante suprime completamente la transcripción del gen, generando haploinsuficiencia en aquellos sujetos portadores. Tbx20 WT, pero no Tbx20 p.R311C, es capaz de ejercer un efecto pro-transcripcional sobre el gen *KCNN3* WT pero no cuando el promotor presenta la mutación. Como se ha mencionado, estudios previos han demostrado que, en condiciones fisiológicas, el tratamiento con apamina (bloqueante selectivo de canales SK3) no modifica la DPA en preparaciones tanto auriculares como ventriculares de diferentes especies, incluyendo el hombre. De hecho, el análisis electrofisiológico de la I_{SK3} registrada en células CHO transfectadas con los canales SK3 al aplicar un protocolo de pulsos con morfología de PA ventricular humano, confirma que la dependencia de tiempo de la conductancia de estos canales es muy similar a la de la morfología del PA, sugiriendo que la relación de la conductancia con el potencial de membrana es lineal. Estos resultados, junto con los ya obtenidos por otros autores, confirman que la corriente generada por los canales SK3 no participa en la fase de repolarización del PA ventricular cardiaco.

De todos estos resultados podemos concluir que la presencia conjunta de las mutaciones en los genes *KCNH2* y *TBX20* es probablemente responsable del SQTTL que afecta al caso índice y al resto de los familiares. Dado que Tbx20 regula de forma selectiva la expresión de los canales cardiacos

hERG, parece razonable proponer que el gen *TBX20* puede actuar como “gen modulador” de la expresión fenotípica del SQTl tipo 2.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral nos permiten concluir:

1. En el caso índice de una familia con SQTl tipo 2 identificamos mediante métodos de secuenciación masiva tres mutaciones en heterozigosis (p.T152HfsX180, p.R311C y c.-66A>G) que afectan a los canales hERG, al factor de transcripción Tbx20 y a la región promotora del gen *KCNN3*, respectivamente.
2. La mutación con desplazamiento del marco de lectura (p.T152HfsX180) de los canales hERG no modifica la densidad de la I_{Kr} en células HL-1 ni la duración de los PAs ventriculares humanos generados por un modelo matemático. De hecho, el péptido hERG p.T152HfsX180 ejerce un *efecto chaperona* sobre los canales hERG WT aumentando la expresión de éstos.
3. El factor de transcripción Tbx20 ejerce un efecto pro-transcripcional sobre el gen *KCNH2* humano lo que aumenta la expresión de canales hERG y la I_{Kr} generada por éstos en hiPSC-CM. De hecho, la sobreexpresión de Tbx20 abrevia la duración de los PAs registrados en estos cardiomiocitos.
4. Por el contrario, Tbx20 p.R311C es incapaz de ejercer dicho efecto pro-transcripcional disminuyendo de forma significativa la expresión de los canales hERG y de la I_{Kr} . Esta disminución de la I_{Kr} prolonga significativamente la duración de los PAs registrados en hiPSC-CM.
5. Ni la forma nativa ni la mutada de Tbx20 regulan la expresión de los canales iónicos que generan las corrientes despolarizantes I_{Na} e $I_{Ca,L}$ y las corrientes de K I_{Ks} , I_f e I_{K1} .
6. La mutación c.-66A>G en la región promotora del gen *KCNN3* suprime completamente la transcripción del gen. Sin embargo, dado que el papel fisiológico de los canales SK3 en la repolarización de los PAs ventriculares humanos es cuando menos desconocido, parece poco

probable que esta mutación fuera la responsable de la prolongación de la DPA implicada en la aparición de SQTl en la familia estudiada.

7. La presencia conjunta de las mutaciones p.R311C en Tbx20 y p.T152HfsX180 en los canales hERG sería responsable del SQTl del caso índice y del resto de miembros de la familia.
8. Por tanto, el gen *TBX20* puede considerarse un gen asociado a SQTl o bien un “gen modificador” cuyas mutaciones podrían contribuir a la disminución de la reserva repolarizante miocárdica y, con ello, a la aparición de SQTl.

SUMMARY

Tbx20 TRANSCRIPTION FACTOR SELECTIVELY REGULATES THE EXPRESSION OF hERG CHANNELS AND THE I_{Kr} DENSITY. POSSIBLE IMPLICATION OF *TBX20* GENE IN THE LONG QT SYNDROME

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Long QT Syndrome (LQTS) is an inherited primary arrhythmogenic syndrome characterized by an excessive and heterogeneous lengthening of the ventricular action potential that eventually leads to the prolongation of the QT interval of the electrocardiogram. Usually, clinical manifestations of the disease affect children and young adults with structurally normal hearts and are associated with the development of ventricular tachyarrhythmias, particularly *torsade de pointes* (TdP), leading to recurrent syncope, seizures, ventricular fibrillation, and sudden cardiac death (SCD).

In the members of a family carrying the same mutation LQTS exhibits a low penetrance and a high phenotypic variability, which has been partly attributed to the concurrence of additional genetic modifiers. At least 17 genes have been reported in autosomal-dominant forms of LQTS. However, mutations in *KCNQ1* (LQT1), *KCNH2* (LQT2), and *SCN5A* (LQT3) represent the most frequent forms of LQTS (75-90% of the cases).

KCNH2 encodes Kv11.1, or hERG, channels which generate the rapid component of the delayed rectifier current (I_{Kr}) that determines the phase 3 of human cardiac action potential (AP) repolarization and plays a critical role in the control of the duration of cardiac AP (APD) and refractoriness. To date, up to 500 different loss-of-function mutations have been identified in the *KCNH2* gene associated to LQT2.

The *TBX20* gene encodes Tbx20 that belongs to the T-box family of transcription factors, which regulate gene expression during embryonic development. In humans, as in the rest of vertebrates, Tbx20 plays an important role in cardiogenesis. Indeed, previous studies have shown that mutations in human *TBX20* result in cardiac malformations including atrial, ventricular and atrioventricular septal defects, mitral valve abnormalities, tetralogy of Fallot, patent foramen ovale, and dilated cardiomyopathy. Importantly, results in flies and mice demonstrated that Tbx20 is also required for maintaining adult heart function, whereas it is currently unknown whether it also participates in the control of adult cardiac function in humans.

In collaboration with the Arrhythmias Unit of the Hospital La Paz and in the context of the ITACA (*Investigación Traslacional de Arritmias Cardiacas hereditarias*) Consortium a male (proband) of a Spanish family of African ancestry who had experienced syncope and diagnosed with LQT2 was identified. Four women of the same family suffered sudden cardiac death, and two of them died suddenly at ages 17 and 19. The penetrance, variability, and expressivity of the LQTS in the studied family suggested that the underlying genetic determinants would be highly complex. Therefore, the **MAIN OBJECTIVE** of this **DOCTORAL THESIS** is to functionally analyze the mutation or mutations carried by the proband and his affected relatives, as well as to identify the electrophysiological mechanism underlying the LQTS in this family.

RESULTS

Next-generation sequencing demonstrated that the proband carries a heterozygous frameshift mutation in the *KCNH2* gene encoding p.T152HfsX180 hERG, a heterozygous missense mutation in the *TBX20* gene encoding p.R311C Tbx20, and a variation at the 5'UTR of the *KCNN3* gene (c.-66A>G) located at the minimal promoter of this gene.

The electrophysiological analysis of p.T152HfsX180 hERG channels in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells demonstrated that the mutant channels did not generate any current *per se*. This result correlates with the fact that p.T152HfsX180 hERG encodes a 332-aminoacid peptide, of which only the first 152 correspond to the actual WT hERG sequence. However, surprisingly this peptide exerts chaperone-like effects on WT hERG channels increasing hERG currents (I_{hERG}) and I_{Kr} recorded in CHO and HL-1 cells. Indeed, co-transfection of WT and p.T152HfsX180 hERG channels generates an I_{Kr} whose density, kinetics and voltage-dependent properties are identical to those of the current generated by WT hERG channels alone. As a consequence, the presence of the mutation did not modify the APD as demonstrated by using a mathematical model of human ventricular AP.

The effects of Tbx20, WT and p.R311C, on the expression of the genes encoding cardiac ion channels were tested by conducting electrophysiological experiments in HL-1 cells, rat ventricular myocytes and hiPSC-CMs, as well as in Western blot (WB) and luciferase assays. Our results demonstrated that Tbx20 WT exerts protranscriptional activity over *KCNH2*, enhancing the expression of hERG channels and the I_{Kr} density. In contrast, despite p.R311C Tbx20 binds to the minimal promoter of the human *KCNH2* gene, it did not exhibit the protranscriptional activity over this gene. Therefore, p.R311C Tbx20 remarkably decreased the expression of hERG channels and the I_{Kr} density. This I_{Kr} reduction was responsible for the significant prolongation of the AP

recorded in hiPSC-CMs and of the AP simulated by using the mathematical model. Tbx20, either WT or mutated, did not modify the expression or activity of the channels responsible for the I_{Ks} , I_f , and I_{Na} in HL-1 cells, for the I_{K1} in rat ventricular myocytes, and for the $I_{Ca,L}$ in hiPSC-CMs.

The *KCNN3* gene encodes the small conductance Ca^{2+} -activated K channel type 3 (SK3). The functional analysis of the c.-66G>A variant located in the minimal promoter of the *KCNN3* gene was conducted by luciferase assays and revealed that this variant completely abolished its transcription, thus leading to a *KCNN3* haploinsufficiency in the carriers. Tbx20 WT, but not p.R311C, was able to exert a protranscriptional effect over the WT *KCNN3* promoter but not over the promoter with the mutation. It has been previously described that treatment of human multicellular atrial and ventricular preparations from different species including humans with apamin (a selective SK channel blocker) does not modify the APD. Indeed, our electrophysiological analysis of SK3 currents (I_{SK3}) recorded by AP command signals as the voltage protocol in CHO cells transfected with the cDNA encoding SK3 channels demonstrated that the time-dependent conductance of the channels is identical to the AP morphology, suggesting that the relationship between conductance and membrane potential is linear. Our results, together with those obtained by other authors, would confirm that the importance of SK3 channels in repolarization of ventricular AP seems to be negligible.

We can conclude that the simultaneous presence of *KCNH2* and *TBX20* gene mutations probably contributes to the LQTS of the proband and the rest of the family. Since Tbx20 selectively regulates the expression of hERG channels, it is reasonable to propose that *TBX20* is a potential LQTS modifier gene.

CONCLUSIONS

The results obtained in this PhD Thesis lead to the following conclusions:

1. In a proband of a Spanish family diagnosed with LQTS type 2 we identified by next generation sequencing three new mutations (p.T152HfsX180, p.R311C y c.-66A>G) affecting hERG channels, the Tbx20 transcription factor and the promoter of the *KCNN3* gene, respectively.
2. The frameshift mutation of hERG channels (p.T152HfsX180) does not modify either the I_{Kr} density in HL-1 cells or the duration of the APs generated by a mathematical model. In fact,

and surprisingly, the hERG p.T152HfsX180 peptide exerts a chaperone-like effect increasing the expression of hERG channels.

3. Tbx20 produces a protranscriptional effect over the human *KCNH2* gene that leads to an increase of the expression of hERG channels and of the I_{Kr} recorded in hiPSC-CM. In fact, Tbx20 overexpression shortens the duration of the AP recorded in hiPSC-CM.
4. Conversely, Tbx20 p.R311C lacks this protranscriptional effect, thus significantly decreasing the expression of hERG channels and the I_{Kr} density. This I_{Kr} decrease significantly lengthens the duration of the AP recorded in hiPSC-CM.
5. Neither the WT nor the mutated form of Tbx20 regulate the expression of the ion channels underlying the depolarizing currents I_{Na} and $I_{Ca,L}$ and the K currents I_{Ks} , I_f , e I_{K1} .
6. The c.-66A>G mutation located at the promoter of the *KCNN3* gene completely abolishes the transcription of the gene. Since the physiological role of SK3 channels in the repolarization of the human ventricular AP is currently unknown, it seems unlikely that this mutation contributes to the prolongation of the APD and the LQTS in this family.
7. The concurrent presence of the p.R311C Tbx20 and p.T152HfsX180 hERG mutations would be responsible for the LQTS of the proband and the affected relatives.
8. Therefore, the *TBX20* gene could be consider as a LQTS associated gene or as modifier gene whose mutations could decrease the myocardial repolarizing reserve and, thus, contribute to the LQTS.

II. Introducción

1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDÍACA

El corazón es un órgano que actúa a modo de bomba, enviando sangre a los distintos tejidos del organismo. Para llevar a cabo su función presenta tejidos especializados en los que se generan automáticamente impulsos que se conducen de forma organizada y provocan la contracción periódica del miocardio. El corazón está formado por tres tipos de tejido: los músculos auriculares y ventriculares, de los que depende su capacidad contráctil, y las fibras del tejido especializado de conducción, encargadas de la transmisión de los impulsos a través del corazón.

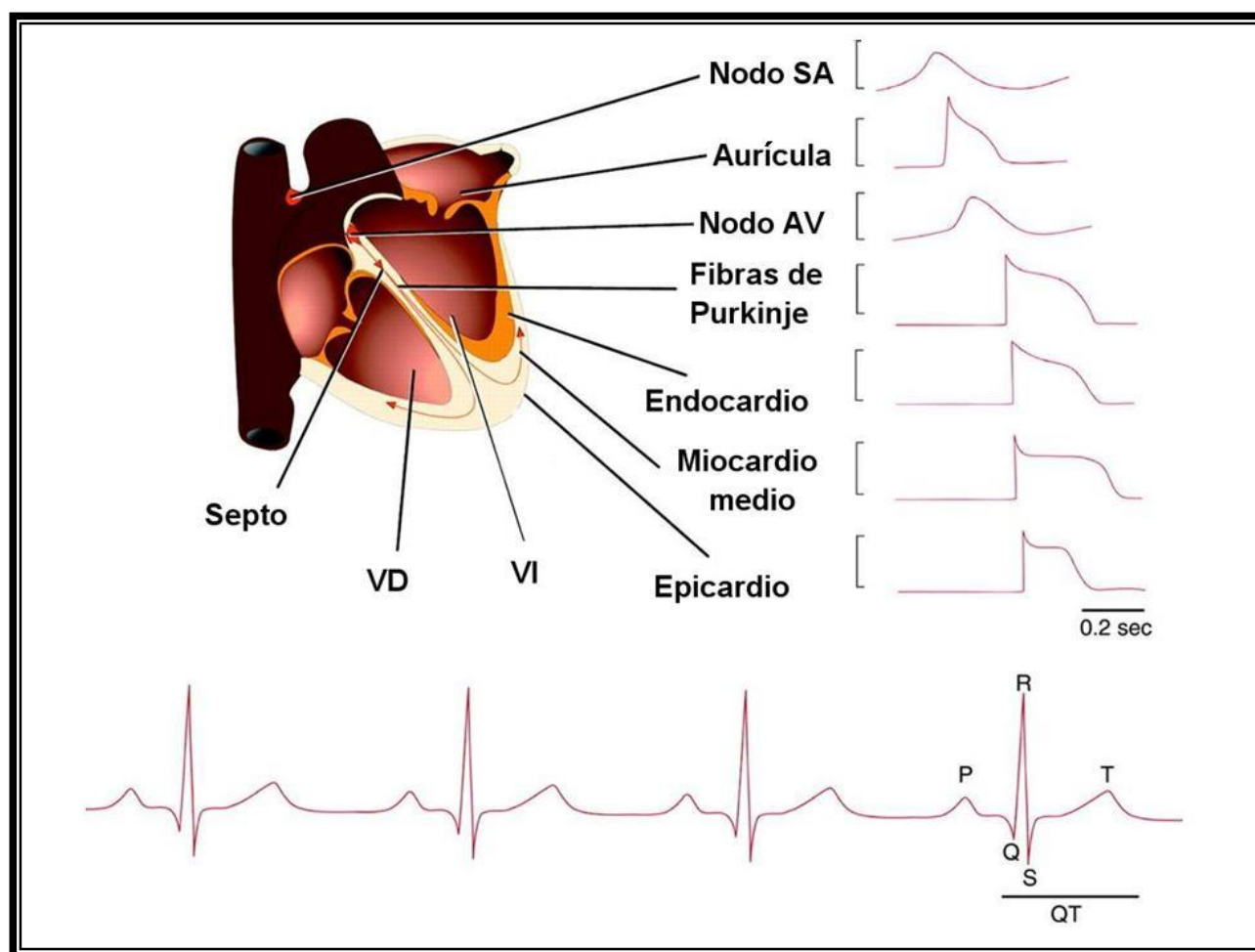


Figura II.1. Representación esquemática de la actividad eléctrica en el miocardio. Se observan los potenciales de acción registrados en diversas zonas del tejido cardíaco y su correlación con el electrocardiograma de superficie. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

En condiciones fisiológicas, el impulso cardíaco nace en el nodo senoauricular (SA), estructura que se localiza en la confluencia de la vena cava superior con la orejuela derecha y la pared lateral de la aurícula derecha (**Figura II.1**). El nodo SA genera unos 60-90 potenciales de acción (PA) por minuto que se propagan sin disminución de amplitud hasta que todas las células cardíacas son excitadas. Desde el nodo SA, el impulso se propaga por todo el tejido auricular a una

velocidad de 0.3 m/s para, a continuación, llegar al nodo aurículo-ventricular (AV), único punto que permite la comunicación eléctrica entre aurículas y ventrículos en condiciones fisiológicas. En el nodo AV, el estímulo se ralentiza antes de pasar al ventrículo (0.01-0.05 m/s). El impulso pasa después a las fibras de transición y al sistema de His-Purkinje, a través del cual se conduce muy rápidamente (2-4 m/s). El haz de His se bifurca en una rama derecha y varias izquierdas, que acaban ramificándose profusamente en fibras de Purkinje, desde donde la activación se extiende por el músculo ventricular, empezando por el septo medio izquierdo y la base de los músculos papilares y, de ahí, al resto de los ventrículos. La rápida velocidad de conducción intraventricular (0.3-4 m/s) tiene como misión permitir que ambos ventrículos se contraigan de forma sincrónica en un corto espacio de tiempo, algo esencial para que se realice de forma eficaz la función de bomba (Hoffman y Cranefield, 1960; Delpón y Tamargo, 2005).

Para comprender este complejo mecanismo, que se repite con cada latido, es necesario conocer algunas propiedades de las células cardíacas tales como la excitabilidad, el automatismo, la refractariedad y la conducción del impulso cardíaco.

1.1. Excitabilidad

La membrana citoplásmica es una barrera que separa dos medios acuosos de diferente composición. Pese a su diferente composición, tanto el medio intracelular como el extracelular han de cumplir el principio de neutralidad eléctrica (la suma de cargas positivas y negativas en el mismo medio debe ser cero) y de equilibrio osmótico (la presión osmótica debe ser idéntica a ambos lados de la membrana). Esta diferencia en la composición de ambos medios origina un gradiente de concentración que induce la difusión de moléculas desde el medio donde están más concentradas hacia el medio en el que lo están menos (**Tabla II.1**). Termodinámicamente, la difusión es un proceso que disminuye el orden del sistema (es decir, que aumenta su entropía), lo que implica que la difusión libera energía. Nernst cuantificó esta energía como una variación de potencial eléctrico:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (\text{II.1})$$

donde ΔG es la energía de Gibbs liberada en el proceso de difusión, R es la constante universal de los gases (8.31 J/mol·K), T es la temperatura absoluta y $[ion]_e$ e $[ion]_i$ son las concentraciones extra e intracelulares del ion que difunde. En el caso de una membrana únicamente permeable al K^+ , éste difundirá desde el interior (donde está más concentrado) hacia el exterior de la célula (donde está

menos concentrado), por lo que en el interior se acumularán más cargas negativas, con lo que volverá a atraer iones K^+ hacia el interior de la célula. La energía de atracción también puede cuantificarse:

$$\Delta G = -E \cdot z \cdot F \quad (\text{II.2})$$

donde E es el potencial transmembrana, z es el número de oxidación del ion en cuestión y F es la constante de Faraday ($9.65 \cdot 10^4$ C/mol). A medida que el K^+ va saliendo de la célula, el gradiente eléctrico se iguala al gradiente químico (de concentración) que causa la difusión:

$$E \cdot z \cdot F = R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (\text{II.3})$$

Reordenando los términos de la igualdad, se obtiene la “ecuación de Nernst” (Nernst, 1888):

$$E = (R \cdot T / z \cdot F) \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (\text{II.4})$$

El potencial al cual el flujo neto a través de la membrana de un ion es nulo recibe el nombre de “potencial de equilibrio” (**Tabla II.1**) y su valor viene dado por la ecuación de Nernst.

Ion	[Ion] _e (mM)	[Ion] _i (mM)	Potencial de equilibrio
Na ⁺	135-145	12	+67
K ⁺	3.5-5	155	-96
Cl ⁻	123	4.2	-90
Ca ²⁺	1.5	10 ⁻⁴ nM	+129

Tabla II.1. Concentraciones extra e intracelulares de los principales iones en condiciones fisiológicas. Los potenciales de equilibrio para cada ion se han obtenido mediante la ecuación de Nernst para una temperatura de 37°C.

La diferencia de potencial que existe a ambos lados de la membrana se denomina potencial de membrana (E_m) y viene determinado por la concentración de iones a uno y a otro lado de la misma, así como por la permeabilidad de la membrana a cada ion (Hoffman y Craneffeld, 1960). Pero, además, algunas células como las nerviosas y las musculares son excitables: son capaces de variar esta diferencia de potencial generando impulsos eléctricos (o PA) en respuesta a un estímulo mediante el intercambio de iones entre los medios intra y extracelular. En el miocardio, estos impulsos se propagan para convertirse en el factor determinante de la contracción rítmica del corazón. El control del intercambio iónico resulta además esencial para evitar una excesiva presión osmótica debida a los cambios en la osmolaridad de ambos medios.

1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular

En condiciones de reposo, el Na^+ y el Ca^{2+} están más concentrados en el medio extracelular, mientras que el K^+ y los aniones orgánicos (proteínas, ATP,...) son los que predominan en el medio intracelular. El transporte de iones a través de la membrana se produce a favor de gradiente de concentración (sin gasto de energía) o en contra de gradiente (y, por lo tanto, con gasto energético) y requiere de sistemas especializados de transporte como los canales iónicos o las proteínas transportadoras.

Los canales iónicos son proteínas transmembrana (TM) cuyas principales funciones son:

- Formar poros hidrófilos a través de los cuales los iones atraviesan la membrana a favor de gradiente de concentración y de potencial eléctrico (gradiente electroquímico), permitiendo el paso de iones masivamente (hasta 10^8 iones/s) y generando una corriente iónica.
- Discriminar los iones que pasan a su través, gracias a un filtro de selectividad. El mecanismo de selectividad se basa tanto en el tamaño del ion como en su carga, de modo que ciertos residuos del canal se alinean en el poro e interaccionan con los iones formando barreras termodinámicas que favorecen el paso de unos iones frente a otros.
- Controlar la permeabilidad de la membrana a cada ion mediante la transición entre los diferentes estados del canal. Entre los diferentes estados del canal se encuentran, al menos, un estado abierto y uno o más no conductores (estados cerrado e inactivo). Los cambios conformacionales de la proteína entre los distintos estados son lo que se denomina el *gating* del canal y se producen de forma muy rápida ($<10 \mu\text{s}$). Según el estímulo que origine estos cambios conformacionales, los canales se clasifican en canales dependientes de voltaje (dependen del E_m), canales activados por ligando (el proceso de apertura y cierre depende de la unión de factores externos como hormonas o neurotransmisores) y canales operados por segundos mensajeros (el *gating* está regulado por factores intracelulares como el Ca^{2+} o subunidades de proteínas G). En el caso de los canales dependientes de voltaje, la proteína presenta una serie de aminoácidos que se encuentran cargados a pH fisiológico y que se mueven en un campo eléctrico muy limitado y confinado en la bicapa lipídica de la membrana celular, originando unas corrientes que se denominan corrientes de *gating* (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974).

Las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de pequeñas moléculas a través de la membrana pero a una velocidad más lenta que la de los canales iónicos (10^2 - 10^4 moléculas/s). Dentro de este grupo se encuentran proteínas como las bombas iónicas o los cotransportadores.

1.1.2. El potencial de reposo

En condiciones normales, las células musculares auriculares y ventriculares y del sistema especializado de conducción presentan un E_m de aproximadamente -85 mV, mientras que en las células de los nodos SA y AV el E_m es de entre -45 y -65 mV. Las células de los nodos SA y AV y del tejido especializado de conducción presentan una propiedad conocida como “automatismo intrínseco”: son capaces de generar PA en ausencia de estímulos externos. Por el contrario, en las células musculares auriculares y ventriculares el valor del E_m se mantiene constante si la célula no es estimulada. A esta diferencia de potencial se le denomina potencial de reposo y está determinado por el equilibrio entre la capacidad de los distintos iones para atravesar la membrana a favor de su gradiente de concentración y el transporte activo de dichos iones en contra de su gradiente.

Si la membrana de las células cardíacas sólo fuera permeable al K^+ , el E_m debería alcanzar un valor similar al del potencial de equilibrio para el K^+ (E_K). Sin embargo, el valor del E_m es menos negativo que el del E_K debido a que la membrana es además permeable a otros iones. Cuando una membrana es permeable a varios iones, el E_m depende de tres factores: la polaridad de la carga eléctrica de cada ion, la permeabilidad de la membrana (P) a cada ion y la concentración de estos iones a ambos lados de la membrana. Por tanto, la ecuación que define el E_m en las células permeables al Na^+ , al Cl^- y al K^+ , denominada “ecuación de campo constante” o “ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz” (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), es:

$$E_m = \left(\frac{RT}{Fz} \right) \ln \left[\frac{([K^+]_e P_K + [Na^+]_e P_{Na} + [Cl^-]_e P_{Cl})}{([K^+]_i P_K + [Na^+]_i P_{Na} + [Cl^-]_i P_{Cl})} \right] \quad (II.5)$$

donde P_K , P_{Na} y P_{Cl} representan la permeabilidad de la membrana al K^+ , al Na^+ y al Cl^- , respectivamente. En esta ecuación queda representado el equilibrio entre la difusión por gradiente de concentración y la atracción eléctrica de los elementos con carga, estando la contribución de cada ion ponderada en función de su permeabilidad, de modo que si una célula es muy permeable al K^+ , el término P_K dominará el valor del E_m .

1.1.3. El potencial de acción

Hasta este momento se ha tratado la permeabilidad relativa de cada especie iónica como una constante. Sin embargo, no es así realmente. Un aumento rápido y transitorio de la permeabilidad al Na^+ provocaría que el potencial de la membrana se hiciese más positivo (el E_m se acercaría al valor del E_{Na} , que es de aproximadamente +65 mV). Si a continuación aumentase de forma rápida y

transitoria la permeabilidad al K^+ , el potencial de membrana tendería al E_K (aproximadamente -96 mV), tal y como especifica la ecuación de Goldman. Estamos en condiciones de entender por qué las células cardíacas son excitables, es decir, por qué estas células, cuando reciben un estímulo de intensidad suficiente para superar el potencial umbral, generan una respuesta eléctrica o PA al que se acopla la contracción cardíaca. Por el contrario, cuando no se alcanza el potencial umbral, sólo se genera una respuesta local que no se propaga a las células colindantes: es un estímulo “todo o nada”. El PA es un cambio transitorio en la polaridad de la membrana resultante de múltiples cambios secuenciales en la permeabilidad de la misma a los diferentes iones y originado por un estímulo externo (la despolarización de células colindantes, neurotransmisores, la “distensión” celular [*stretch*], etc). La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización, con lo que el interior de la célula va haciéndose más positivo (en su valor máximo, el potencial puede alcanzar valores cercanos a +30 mV), mientras que la salida de cargas positivas es responsable de la repolarización.

En el corazón se registran PA de diversas morfologías (**Figura II.1**). En las células musculares auriculares y ventriculares y en las células del sistema de His-Purkinje la despolarización es debida a la rápida entrada de iones de Na^+ , mientras que en las células de los nodos SA y AV la despolarización es debida a la lenta entrada de iones de Ca^{2+} . Por lo tanto, en el corazón existen células que generan PA rápidos o “dependientes de Na^+ ” y células que generan PA lentos o “dependientes de Ca^{2+} ” (**Tabla II.2**) (Coraboeuf y Otsuka, 1956; Beeler y Reuter, 1977; Carmeliet y Vereecke, 1979).

Parámetro	PA rápido	PA lento
Corriente despolarizante en la fase 0	I_{Na}	I_{Ca}
Potencial de reposo (mV)	-85 a -90	-45 a -65
Velocidad de conducción (m/s)	0.5 – 4	0.01 – 0.1
Amplitud del PA (mV)	100 – 300	40 – 85
Velocidad máxima de despolarización (mV/s)	200 – 1000	2 – 15
Factor de seguridad	Alto	Bajo
Inhibido por	TTX, anestésicos locales, antiarrítmicos grupo I	Verapamilo, diltiazem, DHP, Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+}

Tabla II.2. Características de los PAs rápidos y lentos. TTX: Tetrodotoxina. DHP: Dihidropiridinas.

Por otro lado, las diferentes fases del PA cardíaco se corresponden con las fases del electrocardiograma (ECG). Así, la despolarización del PA auricular se corresponde con la onda P.

El intervalo PR refleja la velocidad de conducción a través del nodo AV, el complejo QRS, la despolarización y velocidad de conducción intraventriculares y el intervalo QT, la duración de la repolarización ventricular (**Figura II.1**).

La duración del potencial de acción (DPA) es menor en las células auriculares que en las ventriculares, lo que constituye un mecanismo de protección que evita que los ventrículos puedan responder a frecuencias auriculares muy altas o a una estimulación prematura del corazón. Además, también existen diferencias en la morfología y duración de los PA de diferentes zonas del tejido auricular y ventricular, lo que ha sido atribuido tanto a la expresión de distintos tipos de canales iónicos en dichas zonas como a la distribución heterogénea de la expresión de ciertos canales (**Figura II.1**).

1.1.3.a. PA rápidos o dependientes de Na^+

Los PA rápidos o dependientes de Na^+ presentan 5 fases (**Figura II.2**) (Hoffman y Cranefield, 1960; Nattel, 2002; Delpón y Tamargo, 2005).

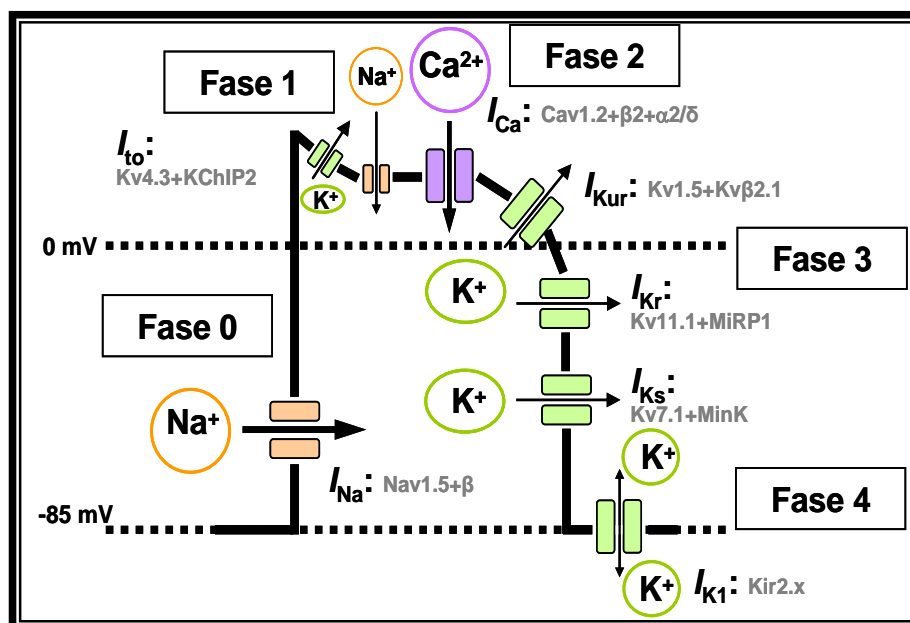


Figura II.2. PA auricular rápido o “dependiente de Na^+ ”. Representación esquemática de las distintas fases del PA, con las corrientes iónicas de entrada y salida implicadas en el mismo, así como las correspondientes subunidades (principales o α y auxiliares o β) que forman los canales que generan dichas corrientes.

La fase 0 de rápida despolarización de las células miocárdicas se debe a la apertura de los canales de Na^+ dependientes de voltaje y, por lo tanto, a la activación de la corriente rápida de entrada de Na^+ (I_{Na}), que desplaza el potencial de membrana desde sus valores en reposo ($\approx -85 \text{ mV}$) hasta valores positivos ($\approx +30 \text{ mV}$). La activación de la I_{Na} es un proceso muy rápido (0.5-2 ms) y su inactivación sigue una cinética biexponencial, con un componente lento (corriente tardía de Na^+ o $I_{\text{Na,L}}$) que se prolonga durante varios cientos de ms y que contribuye al mantenimiento de la fase 2

del PA. La magnitud de la I_{Na} determina la amplitud, la velocidad máxima de despolarización del PA y, por lo tanto, la velocidad de conducción intracardiaca (Hondeghe, 1978; Walton y Fozzard, 1979; Hille, 2001). A continuación, comienza la repolarización celular, en la que se distinguen 3 fases.

La fase 1 de rápida repolarización es consecuencia de la inactivación de la I_{Na} (paso del canal a una conformación no conductora) y de la activación de dos corrientes de salida de K^+ dependientes de voltaje: la corriente transitoria (I_{to1}), que se activa e inactiva rápidamente y que juega un papel fundamental en el control de la DPA sobre todo a nivel auricular y del epicardio ventricular (Boyett, 1981; Josephson y cols., 1984; Giles e Imaizumi, 1988; Shibata y cols., 1989) y el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía, de rápida activación y lenta inactivación (I_{Kur}), que es específicamente auricular (Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993).

La fase 2 (o fase de meseta) representa el fino equilibrio entre dos corrientes de entrada, la I_{Na} (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Gintant y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985) y la corriente de entrada de Ca^{2+} tipo L ($I_{Ca,L}$) (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989; Bers y Pérez-Reyes, 1999), y tres corrientes rectificadoras tardías de salida de K^+ dependientes de voltaje de activación ultrarrápida (I_{Kur}), rápida (I_{Kr}), y lenta (I_{Ks}) respectivamente (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991; Wang y cols., 1993 y 1994).

Durante la fase 3, la inactivación de las corrientes de entrada provoca el predominio de las corrientes repolarizantes de K^+ activadas durante la fase 2 y, como consecuencia, el E_m alcanza de nuevo el valor del potencial de reposo. Además, durante la fase final de la repolarización se produce la salida de K^+ a través de canales que presentan rectificación interna (I_{K1}) (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001). En las células auriculares, el sistema His-Purkinje y en los nodos SA y AV, la acetilcolina (ACh) y la adenosina se unen a sus respectivos receptores (muscarínico M_2 y de adenosina A_1 , ambos acoplados a proteínas G inhibitorias) activando otra corriente que presenta rectificación interna, la corriente de K^+ activada por acetilcolina ($I_{K,ACh}$) (Sakmann y cols., 1983). La activación de la $I_{K,ACh}$ hiperpolariza el E_m y acorta marcadamente la DPA (Shen y Kurachi, 1995; Pelleg y Belardinelli, 1993).

La fase 4 del PA se inicia una vez que el potencial de la célula alcanza de nuevo su valor de reposo y finaliza al comienzo del siguiente PA. En las células musculares auriculares y ventriculares que no son automáticas esta fase es isoelectrica y, por lo tanto, el E_m se mantiene constante durante el periodo comprendido entre el final de un PA y el comienzo del siguiente. El mantenimiento del E_m en niveles constantes durante la fase 4 se debe principalmente a la I_{K1} (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), aunque también están

implicadas la actividad de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ y la del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ los cuales realizan intercambios electrogénicos y contribuyen a restaurar la homeostasis intracelular tras el PA. En las células musculares auriculares y ventriculares que no son automáticas, esta fase es isoeléctrica (el E_m se mantiene constante) gracias principalmente a la I_{K1} (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010). El valor del potencial de reposo depende también de la actividad de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ .

1.1.3.b. PA lentos o dependientes de Ca^{2+}

Los PA dependientes de Ca^{2+} se generan principalmente en las células de los nodos SA y AV, aunque también en las células de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide y en células anormalmente despolarizadas (potencial de reposo de ≈ -45 mV) (Reuter, 1973; Cranefield y Aronson, 1975). A este potencial, la I_{Na} está totalmente inactivada, por lo que la fase 0 de los PA generados en estas células se debe a la lenta entrada de Ca^{2+} al interior celular a través de la $I_{\text{Ca,L}}$.

1.2. Automatismo

Aunque todas las células cardíacas son excitables y responden a los estímulos eléctricos generando PA, algunas además presentan actividad automática, es decir, son capaces de autoexcitarse y generar de forma espontánea PA. En condiciones fisiológicas, las células de los nodos SA y AV, de los tractos internodales auriculares y del sistema especializado de conducción His-Purkinje presentan actividad automática, careciendo de ella las fibras musculares auriculares y ventriculares (Hoffman y Cranefield, 1960). Los PA generados en estas estructuras presentan una fase 4 de lenta despolarización diastólica que desplaza el nivel del E_m hasta el nivel de potencial umbral y, cuando éste se alcanza, se genera un nuevo PA propagado. La frecuencia de disparo de una célula automática depende del potencial diastólico máximo, del nivel de potencial umbral y de la pendiente de la fase 4 de lenta despolarización diastólica.

En condiciones fisiológicas, las células del nodo SA generan PA a mayor frecuencia que las restantes células automáticas (60-80 latidos/min frente a ≈ 15 latidos/min), por lo que actúan como marcapasos dominante y determinan la frecuencia cardíaca, mientras que las demás células automáticas actúan como “marcapasos latentes o subsidiarios”.

1.3. Refractariedad

Desde hace más de 150 años se sabe que el corazón requiere cierto tiempo para recuperar la excitabilidad tras un primer estímulo, tiempo que se conoce como “periodo refractario” (Bowditch, 1871).

En las células que generan PA dependientes de Na^+ , este periodo refractario viene determinado por la cinética de reactivación de la I_{Na} . Los canales de Na^+ permanecen en estado de reposo durante la diástole (fase 4), se abren durante la fase 0 del PA y, a continuación, pasan a un estado inactivo no conductor (que no permite la entrada de Na^+) en el que permanecen hasta que la repolarización alcanza valores más negativos de -50 mV. Dado que el estado inactivo no permite la entrada de Na^+ , la aplicación de un estímulo durante las fases 1 y 2 y al comienzo de la fase 3 es incapaz de generar una respuesta propagada. Al periodo de tiempo durante el que la célula cardíaca es incapaz de generar un PA y permanece inexcitable se le denomina “periodo refractario absoluto” (Weidmann, 1955; Hoffman y Cranefield, 1960; Hondeghem y Katzung, 1977). Conforme el potencial de membrana de la célula se repolariza entre -50 y -90 mV, cierta proporción de los canales de Na^+ pasan del estado inactivo al estado de reposo y, por lo tanto, la aplicación de un estímulo eléctrico es capaz de generar una respuesta. Esta respuesta tendrá menor amplitud y se conducirá tanto más lentamente cuanto menor sea el tiempo transcurrido entre la aplicación del estímulo y el comienzo de la fase 0 del PA previo. En este periodo, llamado “periodo refractario efectivo”, un estímulo supraumbral puede producir una respuesta local, pero no un PA propagado (Hoffman y Cranefield, 1960). Al periodo refractario efectivo, le sigue otro periodo de tiempo durante el cual un estímulo es capaz de inducir la génesis de un PA propagado, denominado “periodo refractario relativo”. A este nivel, la I_{Na} todavía no se ha reactivado por completo, por lo que si se genera un PA prematuro, tendrá menor amplitud y menor duración que un PA generado cuando la célula se ha repolarizado y recuperado por completo su excitabilidad. Estos PA prematuros se propagan más lentamente, es decir, presentan un bajo factor de seguridad de la conducción, y el bloqueo de la misma propicia la aparición de arritmias por reentrada (Hoffman y Cranefield, 1960). La duración del periodo refractario cardíaco determina la máxima frecuencia de estimulación cardíaca y varía con la DPA. Las células auriculares presentan una menor duración del PA y del periodo refractario que las ventriculares (≈ 200 ms en las primeras frente a los ≈ 300 ms de las segundas), y éstas, a su vez, presentan una menor DPA que las células de Purkinje, lo que explica por qué la frecuencia de las arritmias producidas a nivel supraventricular es mayor que las producidas a nivel ventricular. El periodo refractario, además, protege al corazón de aquellas

situaciones en las que la frecuencia es muy rápida, y en las que, por tanto, se impide la relajación completa del músculo cardíaco y disminuyen su función de bomba.

En los nodos SA y AV, la fase 0 del PA es debida a la activación de la $I_{Ca,L}$, corriente que presenta una constante de tiempo de reactivación de entre 100 y 300 ms (Gettes y Reuter, 1974; Bers y Pérez-Reyes, 1999). Por ello, no es posible generar un nuevo PA propagado incluso hasta después de que la célula se haya repolarizado por completo, es decir, que el periodo refractario efectivo se prolonga más allá de la DPA. A este fenómeno se le denomina “refractariedad posrepolarización” (Trautwein y Uchizono, 1963).

1.4. Propagación del impulso cardíaco

La propagación del impulso cardíaco es un fenómeno complejo que depende no sólo del tipo, tamaño, orientación y geometría de las células cardíacas, sino también de las propiedades activas y pasivas de la membrana. Las propiedades activas están determinadas por los mecanismos iónicos dependientes de voltaje y de tiempo responsables de la génesis del PA. Por otro lado, la conducción del impulso cardíaco dependerá también de los factores que determinan el potencial de reposo, el acoplamiento intercelular y las propiedades de cable de la membrana (resistencia y capacitancia), esto es, de las propiedades pasivas de la membrana.

Biofísicamente, la membrana es un elemento dieléctrico que aísla dos medios conductores. Sin embargo, este aislamiento no es perfecto, ya que existen mecanismos de transporte de iones, por lo que la resistencia al paso de cargas que ofrece la membrana ante una diferencia de potencial es finita y medible. Además, el dieléctrico (en este caso, los fosfolípidos de la membrana) que aísla los medios extra e intracelular está sometido a una diferencia de potencial en la membrana, por lo que atrae cargas a las proximidades de la membrana (los aniones del citosol serán atraídos por el exterior positivo y los cationes del medio extracelular son atraídos por el interior negativo). En estas condiciones, la membrana está acumulando carga según la ecuación:

$$Q = E_m \cdot C_m \quad (\text{II.6})$$

donde Q es la carga acumulada y C_m la capacitancia de la membrana, que depende de las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica y de la geometría de la membrana. La C_m impone un retraso en la variación del voltaje y en la propagación del estímulo, ya que cualquier variación en el E_m debe vencer primero la carga acumulada en la membrana.

Los miocitos cardiacos están unidos entre sí por los discos intercalares (DI), que permiten el acoplamiento eléctrico, y por los desmosomas, uniones especializadas que facilitan el acoplamiento contráctil. Estas uniones permiten que el miocardio funcione como un sincitio funcional. Este acoplamiento se realiza a través de uniones de baja resistencia ($1-3 \Omega \cdot \text{cm}^2$, unas 700 veces menor que la de la resistencia externa de la membrana), a las que se denomina “uniones estrechas” (*gap junctions*). En condiciones fisiológicas, la resistencia intracelular es mínima para un acoplamiento célula-célula que facilite la propagación sincrónica.

El impulso cardiaco se genera en el nodo SA y se propaga de forma electrotónica a las células excitables vecinas, desplazando su nivel de E_m hasta el nivel de potencial de membrana de la célula vecina ya excitada. Cuando esto sucede, se genera un nuevo PA, que a su vez despolarizará electrotónicamente las células vecinas y así sucesivamente (**Figura II.3**). Cuanto mayor sea la amplitud de la I_{Na} que genera el PA, mayor será la velocidad de conducción con que éste se conducirá por el miocardio y, por lo tanto, mayor será el margen de seguridad de propagación del impulso cardiaco. Por el contrario, en todas aquellas situaciones en las que la I_{Na} esté parcialmente inhibida o en aquellas células que generen PA dependientes de Ca^{2+} , el margen de seguridad de propagación del impulso será menor (Delpón y Tamargo, 2005).

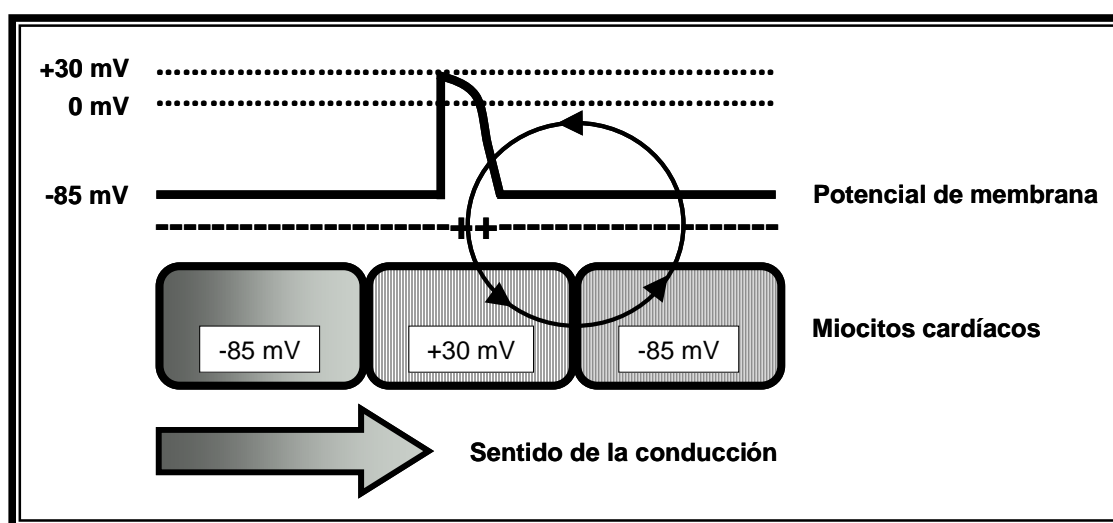


Figura II.3. Representación esquemática de la propagación del impulso cardíaco.

Una vez que los impulsos salen del nodo SA, se propagan con rapidez a toda la aurícula, produciendo la sístole auricular. A su paso a través del nodo AV, la propagación se ralentiza, lo que permite que la contracción auricular impulse la sangre hacia los ventrículos, optimizando el gasto cardiaco y reduciendo la posibilidad de que queden remanentes sanguíneos en la aurícula. Una vez atravesado el nodo AV los impulsos entran en el sistema de conducción, donde la propagación es más rápida, permitiendo finalmente la contracción ventricular coordinada.

2. CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO

2.1. Canales de Na⁺

Los canales de Na⁺ dependientes de voltaje son proteínas TM fundamentales en la génesis y propagación de la señal eléctrica en tejidos excitables como el corazón, el músculo esquelético o el sistema nervioso (Hodgkin y Huxley, 1952a y 1952b; Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; George, 2005). Como se ha mencionado, la I_{Na} cardiaca es responsable de la despolarización (fase 0) de los PA Na⁺-dependientes y, por tanto, de la excitabilidad y la velocidad de conducción cardiacas. Además, participa en el control de la fase de meseta (fase 2) y, por tanto, también es responsable de la DPA y de la refractariedad cardiacas (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985).

2.1.1. Estructura de los canales de Na⁺

Los canales de Na⁺ dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad conductora α (de la que se han caracterizado hasta 9 isoformas) y una o varias subunidades accesorias β (β_1 a β_4) (**Figura II.4** y **Tabla II.5**) (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall y cols., 2005a; Catterall, 2012).

Subunidad α				Subunidad β			
Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido	Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido
SCN1A	Nav1.1* (α_1)	2q24	SNC	SCN1B	Nav β 1.1* (β_1)	19q11	SNC
SCN2A	Nav1.2 (α_2)	2q23	SNC	SCN2B	Nav β 2.1* (β_2)	11q24	SNC
SCN3A	Nav1.3* (α_3)	2q24	SNC	SCN3B	Nav β 3.1* (β_3)	11q26	SNC
SCN4A	Nav1.4* (α_4)	17q21	ME	SCN4B	Nav β 4.1 (β_4)	11q24	SNC
SCN5A	Nav1.5* (α_5)	3p21	MC				
SCN8A	Nav1.6* (α_8)	2q13	SNC				
SCN9A	Nav1.7	2q24	T				
SCN10A	Nav1.8*	3p22	SNP				
SCN11A	Nav1.9	3p21	SNC				

Tabla II.5. Subunidades que forman el canal de Na⁺ dependiente de voltaje en el humano. *Subunidades que se expresan en el corazón, siendo Nav1.5 la isoforma predominante en éste. MC: Músculo cardiaco. ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico. T: Tiroides. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

El gen *SCN5A* codifica la subunidad α Nav1.5, responsable de la I_{Na} cardiaca. Esta subunidad, de unos 227 kDa de peso molecular, está formada por 4 dominios homólogos (DI a DIV), conectados entre sí mediante tres secuencias hidrofílicas no conservadas, denominadas “*interdomain linker loops*”. Cada dominio está formado por 6 segmentos TM dispuestos en α -hélice

cada uno (S1 a S6). Los segmentos S4 presentan un residuo cargado (arginina o lisina) cada tres aminoácidos, formando una hélice de cargas positivas en la membrana que actúan como “sensor de voltaje”. Por otro lado, el lazo que une los segmentos S5 y S6, denominado “lazo P”, es extracelular, forma parte del poro y determina la selectividad iónica (Poet y cols., 2001; Payandeh y cols., 2011; Catterall, 2014). Cuatro de los residuos presentes en los lazos P forman un anillo que se denomina “locus DEKA”: ácido aspártico en DI, ácido glutámico en DII, lisina en DIII y alanina en DIV. Esta estructura determina la conductancia y la selectividad iónica del canal al Na^+ , así como la unión de toxinas (Noda y cols., 1989; Terlau y cols., 1991). La sustitución de estos cuatro aminoácidos por residuos de ácido glutámico (que son los aminoácidos presentes en las posiciones análogas en el canal de Ca^{2+}) convierte los canales de Na^+ en selectivos para el Ca^{2+} (Heinemann y cols., 1992).

Los extremos amino- y carboxilo-terminal (N- y C-terminal, respectivamente) y los lazos de unión entre los diferentes dominios son intracelulares (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Yu y Catterall, 2003; George, 2005) (**Figura II.4**). La región C-terminal del canal Nav1.5 (los 243 últimos aminoácidos) contiene varios dominios importantes de interacción con proteínas, de los cuales los mejor caracterizados son el dominio IQ de unión a calmodulina (CaM), un dominio PY y un dominio de unión a PDZ (Shy y cols., 2013). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que, además del dominio canónico de unión a PDZ en el extremo C-terminal, existe otro dominio de unión a secuencias PDZ en la región “interna” del dominio N-terminal gracias al cual los canales Nav1.5 pueden unirse a la proteína de anclaje $\alpha 1$ -sintrofina. Esta característica hace que el dominio N-terminal de dichos canales *per se* sea capaz de ejercer un “efecto chaperona”, modulando positivamente la expresión en la membrana celular de otros canales que también se unan a la $\alpha 1$ -sintrofina, como son los canales de K^+ con rectificación interna Kir2.1/Kir2.2 (ver descripción detallada de estos canales más adelante) (Matamoros y cols., 2016).

Se ha descrito que la subunidad Nav1.5 no es la única isoforma cuyo ARN mensajero (ARNm) se expresa en el corazón (Nerbonne y Kass, 2005). De esta manera, subunidades que típicamente se expresan a nivel neuronal como Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 y Nav1.8, han sido también detectadas en cardiomiocitos (Maier y cols., 2004; Westenbroek y cols., 2013) e incluso algunas de ellas, como Nav1.4 y Nav1.8, parecen estar implicadas en la regulación de la I_{Na} cardíaca (Hu y cols., 2014; Bissay y cols., 2016).

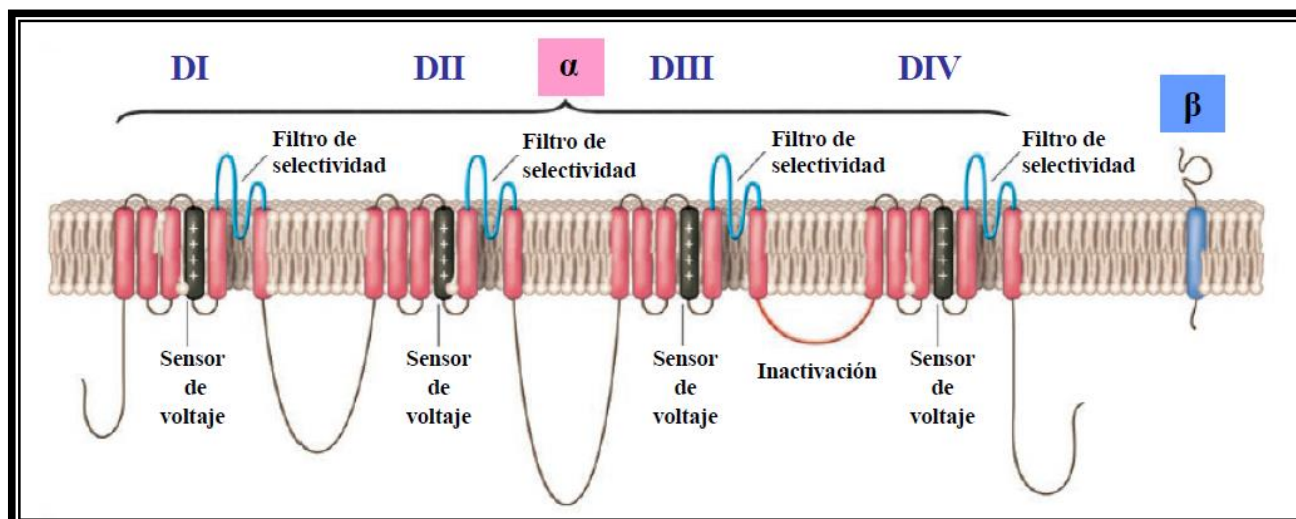


Figura II.4. Estructura del canal de Na^+ . Esquema de las subunidades α y β del canal de Na^+ . En la subunidad α , se indica el sensor de voltaje, el filtro de selectividad y los diferentes dominios (DI a DIV). [Adaptada de George, 2005]

Por su parte, la subunidad auxiliar β , de la cual se conocen 4 isoformas (β_1 a β_4) (Morgan y cols., 2000; Goldin, 2002), son proteínas con un único dominio TM, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular, que presentan una secuencia tipo inmunoglobulina que las diferencia del resto de subunidades accesorias (Isom y Catterall, 1996). Todas las isoformas identificadas se encuentran en el SNC, pero sólo algunas de ellas se han encontrado en el corazón (**Tabla II.5**).

Estas subunidades no forman parte del poro conductor del canal, pero regulan el *gating* del mismo, la expresión en la membrana de las subunidades α y la unión con otras moléculas de la matriz extracelular y del citoesqueleto (Isom y Catterall, 1996). Asimismo, se ha demostrado que la subunidad Nav β 1.1 disminuye la afinidad de anestésicos locales y fármacos antiarrítmicos del grupo I por la subunidad α Nav1.5 (Balser y cols., 1996; Makielski y cols., 1996; Balser, 2001).

2.1.2. Características de la I_{Na}

La I_{Na} es la responsable de la fase 0 de los PA generados en las células musculares auriculares y ventriculares y en el sistema de His-Purkinje (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985).

El canal de Na^+ presenta, al menos, tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo. Durante la diástole, cuando el potencial eléctrico TM está alrededor de los -85 mV, el canal se encuentra en estado de reposo y la probabilidad de que se abra es extremadamente baja. La despolarización de la membrana produce un cambio conformacional en la estructura del canal que causa su apertura durante 1-2 ms, generándose una corriente rápida de entrada de Na^+ (Hirschberg y cols., 1995; Yang y Horn, 1995). El umbral de activación de la corriente se encuentra en -60 mV y

alcanza su valor máximo entre -30 y -20 mV (Hodgkin y Huxley, 1952a y 1952b; Armstrong, 1981). A continuación, el canal se inactiva rápidamente, lo que produce el cese de la entrada de Na^+ (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003) (**Figura II.5**). La inactivación no sólo cierra el canal, sino que impide la reapertura del mismo hasta que haya pasado el tiempo suficiente para su recuperación, determinando así la frecuencia máxima de excitación celular y preservando el gradiente iónico intracelular, lo que impide la muerte celular. El paso desde el estado inactivo hasta el estado de reposo se denomina “reactivación del canal” y es un proceso necesario para que el canal pueda volver a abrirse. En situaciones fisiológicas, esta transición tiene lugar durante los primeros 50-100 ms de la diástole por lo que, considerando que en ritmo sinusal, el intervalo diastólico es de entre 500 y 700 ms, cuando llega el siguiente latido la mayoría de los canales ya están en fase de reposo y, por lo tanto, preparados para volver a abrirse (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003).

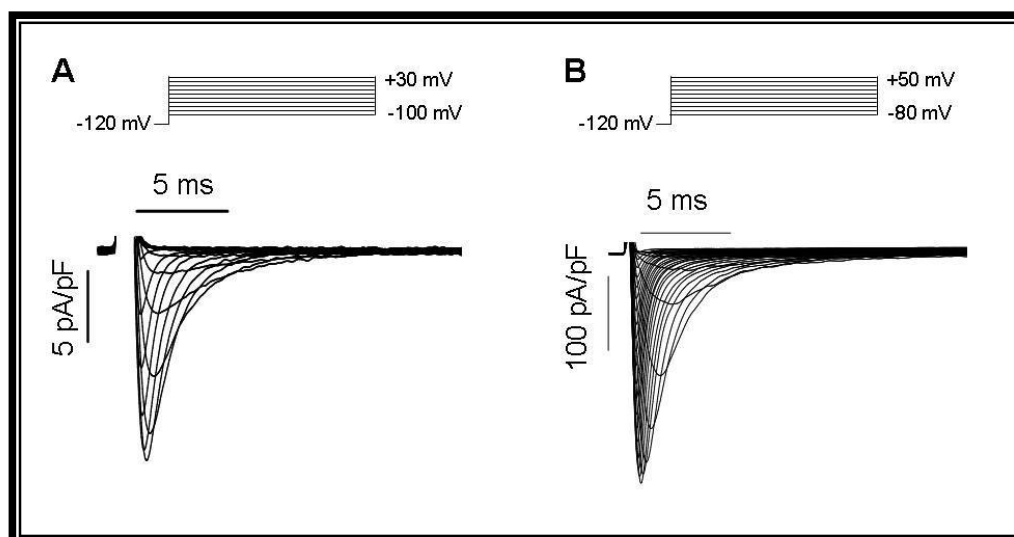


Figura II.5. Características de la I_{Na} cardíaca. (A) Trazos de I_{Na} registrados en nuestro laboratorio a partir de miocitos auriculares humanos tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -100 y +30 mV desde un potencial de fijación de -120 mV con una concentración de Na^+ en la solución externa de 5 mM. (B) I_{Na} registrada en nuestro laboratorio en células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con las subunidades α Nav1.5 y β 1 tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -80 y +50 mV desde un potencial de fijación de -120 mV con una concentración de Na^+ en la solución externa de 136 mM.

La inactivación de la I_{Na} cardíaca sigue un proceso biexponencial, presentando un componente rápido y uno lento (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Balser, 2001). La inactivación rápida del canal de Na^+ se produce por el mecanismo denominado de “bola y cadena” (Armstrong y Bezanilla, 1977), mientras que la “inactivación lenta” es un proceso que se prolonga durante varios cientos de ms y es responsable del control de la entrada de Na^+ durante la fase de meseta del PA cardíaco, contribuyendo de este modo al

mantenimiento de dicha fase del PA (Clarkson y cols., 1984; Carmeliet, 1987; Fozzard y cols., 1987; Balser, 2001).

Por último, una mínima fracción de canales de sodio puede permanecer abierta y no inactivarse completamente. Esta fracción de corriente de sodio ha sido denominada y estudiada como $I_{Na,L}$ (corriente tardía de sodio, persistente o *late*) y se encuentra aumentada en estados patológicos relacionados con eventos arritmogénicos que implican una prolongación de la fase 2 del PA (Undrovinas y cols., 2002; Valdivia y cols., 2004; Maltsev y cols., 2007; Shryock y cols., 2013).

2.2. Canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje permiten la entrada de Ca^{2+} en respuesta a la despolarización de la membrana y son esenciales para acoplar las señales eléctricas en la superficie celular con la respuesta fisiológica a nivel celular (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989). Inicialmente, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se clasificaron según la magnitud de la despolarización requerida para su activación: los que requerían una fuerte despolarización (HVA, *High Voltage Activated* o *Long-lasting*) y los que requerían una despolarización menor (LVA, *Low Voltage Activated*). Los canales LVA son los que hoy en día se conocen como canales de Ca^{2+} tipo T, que se activan rápidamente a $E_m \approx -50$ mV y se inactivan también rápidamente (Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Los canales HVA se abren cuando se despolariza la membrana hasta ≈ -30 mV y su inactivación puede prolongarse hasta 100 milisegundos. Hasta el momento, se han identificado 5 subtipos de canales HVA (L, N, P, Q y R) que presentan diferentes propiedades cinéticas, biofísicas y farmacológicas. En el miocardio humano sólo se ha demostrado la presencia de los canales de Ca^{2+} tipo L y tipo T.

Los canales tipo L presentes en los miocitos cardiacos determinan la fase de meseta del PA. Se localizan principalmente en los túbulos T, desde donde promueven la apertura de los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico (RyR2), con la consiguiente salida de Ca^{2+} desde el mismo (lo que se denomina “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ”). Por su parte, los canales tipo T se localizan principalmente en las células auriculares y en las células automáticas del nodo SA y de las fibras de Purkinje, mientras que su presencia en las células ventriculares es mínima (Mitra y Morad, 1986; Yuan y cols., 1986; Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989). Debido a este patrón de expresión, se ha propuesto que los canales tipo T pueden participar en la regulación del automatismo cardiaco (Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Wu y Lipsius, 1990).

2.2.1. Estructura de los canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son heterotetrámeros compuestos por las subunidades α_1 , β y α_2/δ , y, en algunos tejidos, la subunidad γ (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005; Rougier y Abriel, 2016). Hasta ahora, se han identificado los genes que codifican la expresión de 10 subunidades α_1 (**Tabla II.6**), 4 subunidades β , 4 complejos α_2/δ y 8 subunidades γ , aunque a nivel cardíaco sólo se ha demostrado la existencia de las subunidades reguladoras β y α_2/δ . Los diferentes tipos de corriente de entrada de Ca^{2+} (I_{Ca}) se definen en función de la subunidad α_1 que forma el canal, mientras que las subunidades reguladoras modulan su tráfico a membrana y/o las propiedades biofísicas de la corriente (**Figura II.6**) (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005; Rougier y Abriel, 2016).

	Nomenclatura acorde con ¹	Nomenclatura acorde con ^{2,3}	Nomenclatura estructural ⁴
Canales HVA	Tipo L	α_{1S} α_{1C} α_{1D} α_{1F}	Cav1.1 Cav1.2 Cav1.3 Cav1.4
	Neuronales Tipo P/Q Tipo N Tipo R	α_{1A} α_{1B} α_{1E}	Cav2.1 Cav2.2 Cav2.3
Canales LVA	Tipo T	α_{1G} α_{1H} α_{1I}	Cav3.1 Cav3.2 Cav3.3

Tabla II.6. Clasificación de las diferentes subunidades que forman el poro de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

¹ Tsien y cols., 1988; ² Snutch y cols., 1990; ³ Birnbaumer y cols., 1994; ⁴ Ertel y cols., 2000. [Adaptada de Lacínová, 2005]

Dentro de las subunidades α_1 que forman los canales de Ca^{2+} tipo L, la subunidad Cav1.2 (α_{1C}) es la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005; Zamponi y cols., 2015; Rougier y Abriel, 2016). Se han identificado tres variantes de la isoforma Cav1.2 (Cav1.2a-c), de las que la Cav1.2a es la isoforma específicamente cardíaca. Por su parte, la familia Cav3 codifica las subunidades α_1 de los canales tipo T (Pérez-Reyes, 2003).

Los canales de Ca^{2+} presentan una gran homología estructural con los canales de Na^{+} dependientes de voltaje. Las subunidades α_1 presentan 4 dominios homólogos (DI a DIV), cada uno compuesto por 6 segmentos TM en hélice- α (S1 a S6) (**Figura II.7**). El canal de Ca^{2+} presenta 4 cargas positivas en los S4 de cada dominio, dando lugar al sensor de voltaje. Estos residuos cargados están altamente conservados en todas las familias de canales de Ca^{2+} . También, como en

los canales de Na^+ , el lazo P que une los S5 y S6 de los cuatro dominios se hunde en la membrana y contribuye a formar el poro del canal. Cada uno de los lazos P del canal de Ca^{2+} contiene un residuo de glutámico (“locus EEEE”). Estos residuos forman una zona de alta afinidad por el Ca^{2+} (similar al locus DEKA de los canales de Na^+) y forman el filtro de selectividad del canal (Mikala y cols., 1993; Klockner y cols., 1996; Koch y cols., 2000).

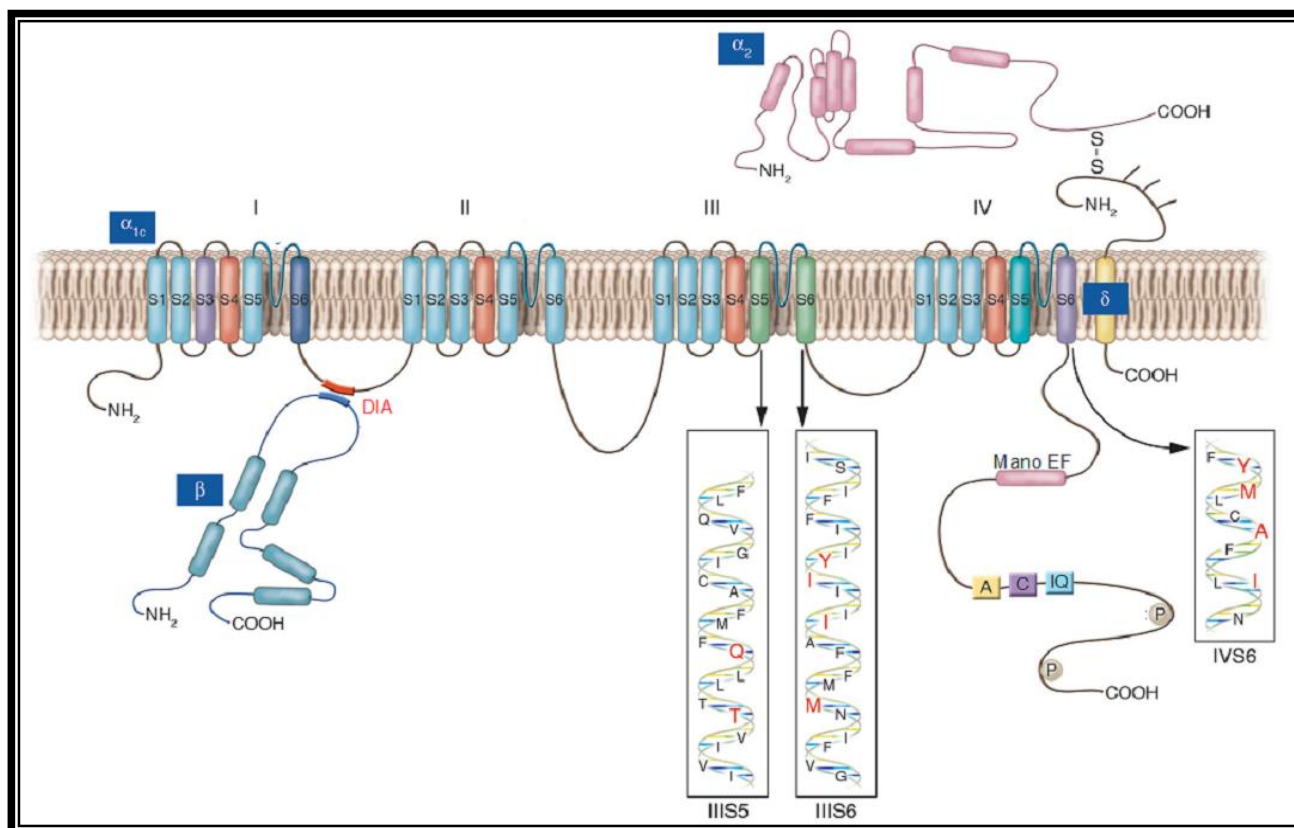


Figura II.6. Estructura del canal de Ca^{2+} tipo L. [Adaptada de Bodi y cols., 2005]

Dentro de las subunidades reguladoras, las subunidades β son proteínas citosólicas que se ensamblan con las subunidades α_1 mediante un dominio de interacción β (DIB) que se une al dominio de interacción α (DIA) de la subunidad α_1 (**Figura II.6**) (De Waard y cols., 1994; Pragnell y cols. 1994). La subunidad β predominante en el miocardio humano es la Cav β 2b codificada por el gen *CACNB2b* (Buraei y Yang, 2010). Por su parte, el complejo α_2/δ está formado por la unión mediante un puente disulfuro de la subunidad extracelular α_2 y la subunidad TM δ (**Figura II.6**). De todas las isoformas, la que se considera predominante en el miocardio humano es la $\alpha_2\delta_1$ codificada por el gen *CACNA2D1* (Burashnikov y cols., 2010).

2.2.2. Características de la $I_{Ca,L}$

La $I_{Ca,L}$ registrada en miocitos cardiacos presenta un potencial umbral de activación de alrededor de -30 mV y alcanza su máxima amplitud entre 0 y +10 mV. La activación y la inactivación son relativamente lentas, alcanzándose el pico máximo al cabo de 1-5 milisegundos (**Figura II.7, panel A**). La inactivación de la corriente es un proceso dependiente del voltaje y de la $[Ca^{2+}]_i$ (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985; Zhang y cols., 1994). En la inactivación dependiente de voltaje, el lazo DI-DII actúa como partícula bloqueante del canal (Kim y cols., 2004). La inactivación debida a altas $[Ca^{2+}]_i$ representa un mecanismo de retroalimentación negativo de gran importancia (Brehm y Eckert, 1978) en el que están implicados un motivo de unión a calmodulina (CaM) (el “motivo IQ”), un motivo en “mano EF” y los péptidos A y C que se encuentran en el extremo C-terminal del canal (**Figura II.6**) (Zuhlke y cols., 1999; Peterson y cols., 2000). Así, tras la despolarización y la entrada de Ca^{2+} , la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta hasta el rango micromolar, lo que hace que el Ca^{2+} se una a la CaM asociada al canal y se promueva la inactivación y por tanto el cese de la entrada de Ca^{2+} al miocito cardiaco. Los canales de Ca^{2+} tipo L son también permeables al Ba^{2+} . De tal forma que cuando se utiliza Ba^{2+} como ión conductor en lugar de Ca^{2+} , se suprime la inactivación dependiente del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y por tanto la disminución de la corriente es menor y con una cinética más lenta (**Figura II.7, panel B**).

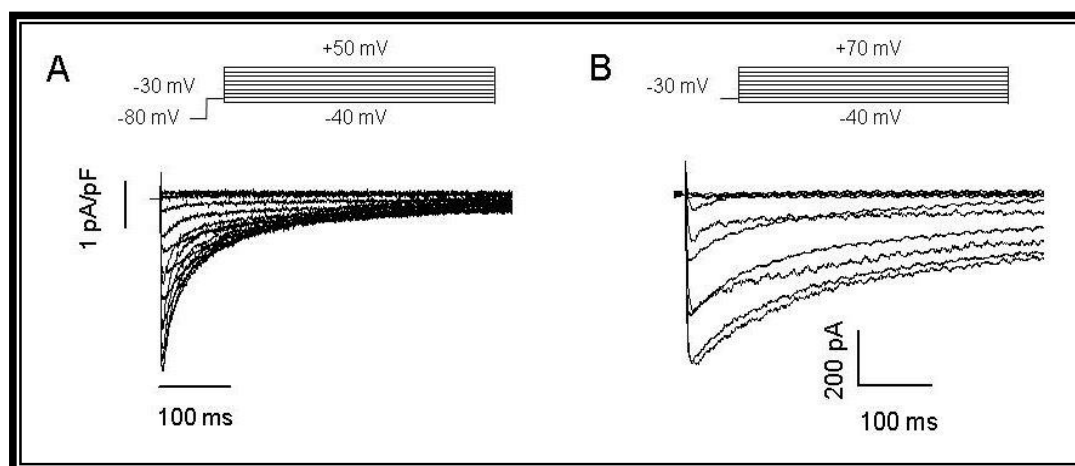


Figura II.7. Características de la corriente generada por los canales de calcio tipo L. (A) $I_{Ca,L}$ registrada en nuestro laboratorio en miocitos auriculares humanos tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptada de Pérez-Hernández y cols., 2016]. (B) Corriente de Ba^{2+} generada por los canales de Calcio tipo L registrada en nuestro laboratorio en células HL-1 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior [Adaptada de Barana y cols., 2014]

2.3. Canales de K^+

Los canales de K^+ constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas de membrana. Se distribuyen ubicuamente a lo largo de toda la escala filogenética y están presentes prácticamente en todas las células, donde juegan un importante papel, por ejemplo, en el mantenimiento del potencial de reposo celular, la frecuencia de disparo de las células automáticas, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales o la regulación de la contracción del músculo liso esquelético y cardíaco.

A nivel cardíaco, los canales de K^+ juegan un papel fundamental en el PA, ya que permiten la salida de K^+ de la célula, lo que conduce a la repolarización celular. Las cinéticas de activación e inactivación de cada canal determinan su participación en el control de la excitabilidad celular: los canales que se activan rápidamente intervienen en la repolarización durante las primeras fases del PA, mientras que los canales que generan corrientes rectificadoras tardías que se activan lentamente participan fundamentalmente en la repolarización durante la fase 3. Los canales de K^+ presentan una distribución heterogénea en función del tejido (aurícula frente a ventrículo) e incluso dentro de un mismo tejido (endocardio frente a epicardio). La heterogeneidad en los tipos y en la distribución de los canales de K^+ determina la diferencia en la morfología de los PA de las distintas regiones del corazón (**Figura II.1**). Además, la expresión y las propiedades de los canales de K^+ también pueden verse modificadas por fármacos, hormonas y diferentes enfermedades o patologías.

Los canales de K^+ se clasifican de acuerdo al número de segmentos TM y de poros que presentan (**Figura II.8**):

- ❖ Canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P). Incluye también a los canales de K^+ activados por Ca^{2+} , que presentan un segmento TM adicional (S0) en el extremo N-terminal.
- ❖ Canales formados por 4 segmentos TM y 2 poros (4TM/2P).
- ❖ Canales formados por 8 segmentos TM y 2 poros (8TM/2P), sólo encontrados en levaduras.
- ❖ Canales formados por 2 segmentos TM y 1 poro (2TM/1P).

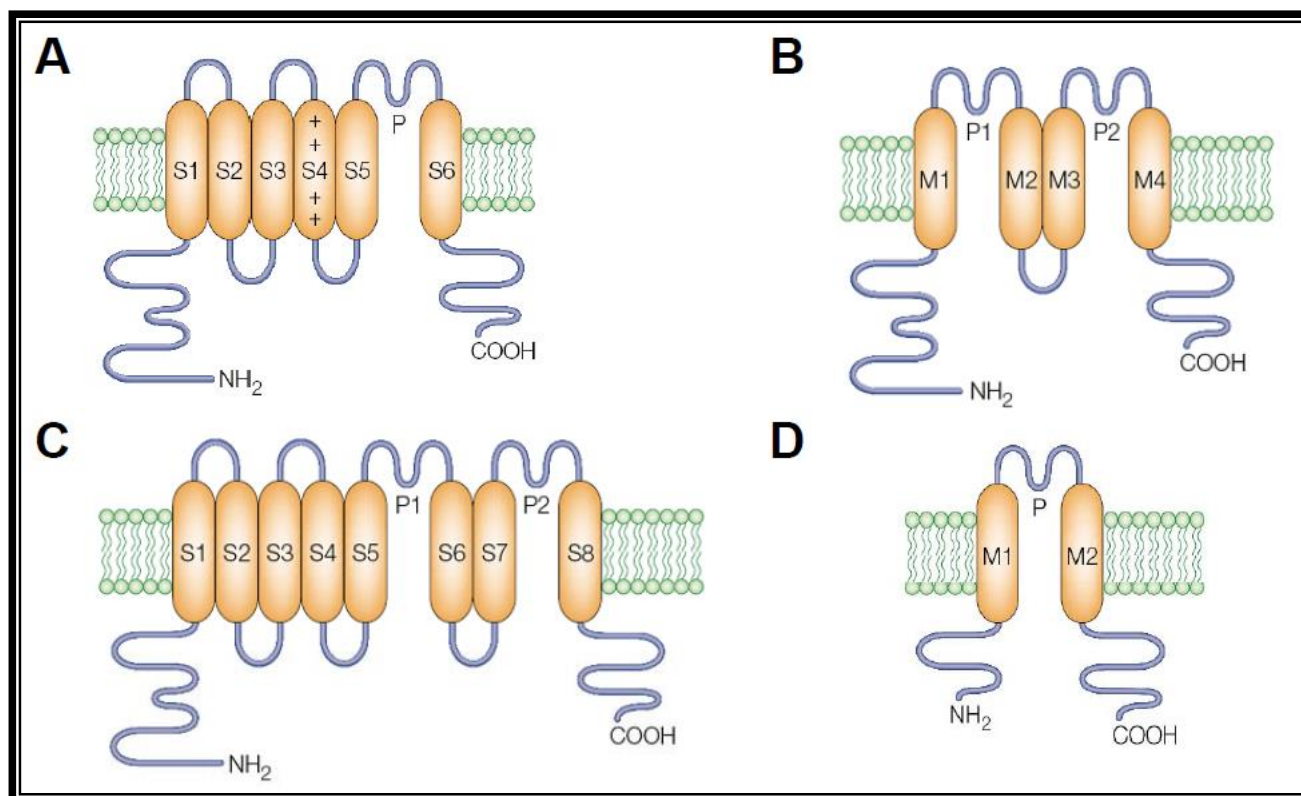


Figura II.8. Topología de la subunidad α de los cuatro grandes grupos de canales de K^+ . (A) Canales 6TM/1P. (B) Canales 4TM/2P. (C) Canales 8TM/2P. (D) Canales 2TM/1P. [Adaptadas de Choe, 2002]

2.3.1. Canales 2TM/1P

Los canales 2TM/1P (**Figura II.8D**), también denominados canales de K^+ rectificadores internos (Kir), desempeñan varias funciones importantes como el control de la señalización neuronal, la frecuencia cardíaca o la liberación de insulina. Desde un punto de vista evolutivo, los canales 2TM/1P son los más antiguos.

Actualmente, la familia de canales Kir se compone de 7 subfamilias (Kir1 a Kir7) (**Tabla II.7**), con distintas propiedades, diferente distribución y más o menos bien definidas funciones fisiológicas para cada una de ellas (Kubo y cols., 2005). Dentro de éstas, los canales Kir se pueden dividir en 4 grupos: los canales que participan en el mantenimiento del potencial de reposo (Kir2), los canales acoplados a proteínas G (Kir3), los canales sensibles a ATP (Kir6) y los canales transportadores de K^+ (Kir1, Kir4 y Kir7).

Las proteínas Kir presentan entre 327 y 501 aminoácidos y una homología estructural de entre un 30 y un 40%, mientras que dentro de cada subfamilia el grado de homología llega a alcanzar el 60%.

Todos los canales Kir presentan una relación densidad de corriente-voltaje con rectificación interna a pesar de que existen grandes diferencias en su grado de rectificación. Las subfamilias Kir2

y Kir3 son las que presentan una rectificación interna más marcada (los canales que se han denominado como “muy rectificadores”), mientras que algunas de ellas, como la subfamilia Kir6, presentan una rectificación interna mucho más débil (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

Familia	Corriente	Proteína	Gen	Cromosoma	Localización
Kir1 (ROMK)		Kir1.1-1.3	<i>KCNJ1</i>	17q25	Riñón, corazón, páncreas
Kir2 (IRK)	I_{K1}	Kir2.1	<i>KCNJ2</i>	17q23.1-24.2	Corazón, SNC, ME, ML, pulmón, placenta, riñón
	I_{K1}	Kir2.2	<i>KCNJ12</i>	17p11.1	Corazón
	I_{K1}	Kir2.3	<i>KCNJ4</i>	22q13.10	Corazón, SNC, ME
		Kir2.4	<i>KCNJ14</i>	19q13.1-13.3	Corazón, SNC, retina
		Kir2.5	-	-	Corazón (<i>Carassius carassius</i>)
		Kir2.6	<i>KCNJ18</i>	17p11.2	ME
Kir3 (GIRK)	$I_{K,ACh}$	Kir3.1	<i>KCNJ3</i>	2q24.1	Corazón, cerebelo
		Kir3.2	<i>KCNJ6</i>	21q22.13-22.2	Corazón, páncreas
		Kir3.3	<i>KCNJ9</i>	1q21-23	SNC
	$I_{K,ACh}$	Kir3.4	<i>KCNJ5</i>	11q24	Corazón, páncreas
Kir4 (BIR10)		Kir4.1	<i>KCNJ10</i>	1q22-q2	Glía
		Kir4.2	<i>KCNJ15</i>	21q22.2	Riñón, pulmón, SNC
Kir5		Kir5.1	<i>KCNJ16</i>	17q23.1-24.2	SNC, SNP
Kir6	$I_{K,ATP}$	Kir6.1	<i>KCNJ8</i>	12p11.23	Heterogénea
	$I_{K,ATP}$	Kir6.2	<i>KCNJ11</i>	11p15.1	Heterogénea
Kir7		Kir7.1	<i>KCNJ13</i>	2q37	SNC, riñón, tiroides

Tabla II.7 Familias de canales de K^+ 2TM/1P en mamíferos. ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico.

2.3.1.a. Mecanismo de rectificación interna en los canales Kir

Los canales iónicos se pueden considerar como resistencias eléctricas situadas en la membrana plasmática que pasan cargas en forma de iones entre dos compartimentos (los medios intra y extracelular). Dada una resistencia la relación entre la intensidad de la corriente y el voltaje es lineal y se describe mediante la ley de Ohm (conductancia óhmica):

$$\text{Intensidad} = \text{Voltaje} / \text{Resistencia} \quad (\text{II.7})$$

Las corrientes que presentan rectificación interna no tienen una relación densidad de corriente-voltaje lineal puesto que en un rango de voltaje de entre -60 y -20 mV (dependiendo del canal y las concentraciones de K^+ intra y extracelulares) se produce una reducción muy marcada de

la amplitud de la corriente (“pendiente negativa”). A potenciales más positivos de -20 mV la amplitud de la corriente se mantiene en valores mínimos). Como resultado los canales de K^+ que presentan rectificación interna generan una corriente de entrada de gran amplitud a potenciales más negativos del E_K , mientras que a potenciales más positivos generan una corriente de salida de amplitud mucho menor (**Figura II.9**).

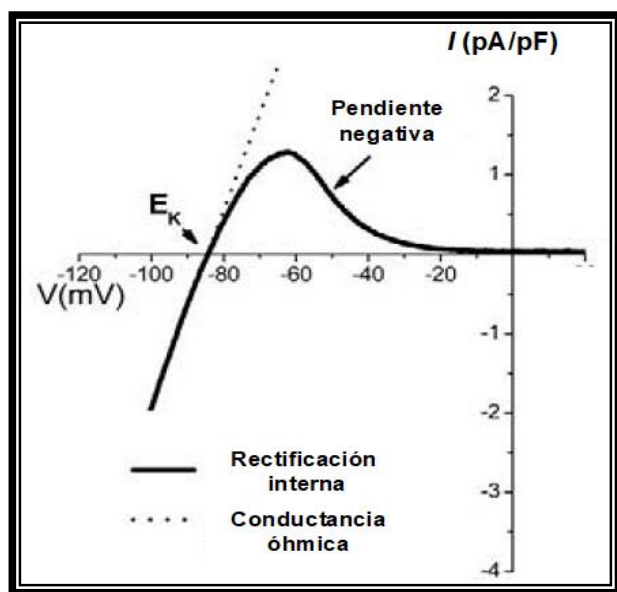


Figura II.9. Características de la rectificación interna en la I_{K1} . (A) Relación densidad de corriente-voltaje de la I_{K1} . Se muestra el E_K y la corriente esperada si el comportamiento del canal siguiese la ley de Ohm (línea punteada). [Adaptada de Dhamoon y Jalife, 2005]

A finales de los años 80, se demostró que el Mg^{2+} intracelular podía ocasionar la rectificación interna de la I_{K1} en miocitos ventriculares a través del bloqueo del poro del canal (Matsuda y cols., 1987; Vanderberg, 1987), aunque el bloqueo voltaje-dependiente producido por el Mg^{2+} no era suficiente como para explicar la rectificación interna (Oliva y cols., 1990; Martin y cols., 1995). A partir de entonces, diversos trabajos han demostrado que la rectificación interna de los canales Kir se debe al potente bloqueo dependiente de voltaje producido por una familia de cationes orgánicos intracelulares denominados poliaminas (espermina, espermidina y putrescina) (Fakler y cols., 1994; Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994; Fakler y cols., 1995).

Las poliaminas están presentes en todos los tipos celulares y sus concentraciones intracelulares alcanzan el rango milimolar bajo (Cohen, 1998). Sin embargo, sólo las poliaminas libres originan la rectificación de los canales Kir (Yan y cols., 2005) y la mayoría de las poliaminas se encuentran unidas a diferentes moléculas intracelulares como el ADN, el ARN o el ATP (Watanabe y cols., 1991). Entre las poliaminas, la espermina (tetraivalente) es la más potente a la hora de ocasionar rectificación interna, seguida de la espermidina (trivalente) y la putrescina (divalente) y la cadaverina (divalente) (Lopatin y cols., 1994; Baronas y Kurata, 2014).

De acuerdo por tanto con el conocimiento actual, la rectificación interna es consecuencia de la entrada de poliaminas y Mg^{2+} en el interior del poro iónico cuando éstas son repelidas desde el

interior celular por la despolarización. Por el contrario, la hiperpolarización del interior celular atrae a las poliaminas y el Mg^{2+} hacia la cara citoplásmica de la membrana, lo que produce su disociación de sus sitios de unión en el poro del canal.

2.3.1.b. Estructura de los canales Kir

En 1998 se describió por primera vez la estructura cristalográfica mediante difracción con rayos X de un canal de K^+ , el canal bacteriano *KcsA* (Doyle y cols., 1998). Gracias a este estudio y a las cristalizaciones posteriores de otros canales 2TM/1P tanto bacterianos, *MthK* (Jiang y cols., 2002a y 2002b) y KirBac (Kuo y cols., 2003), como de mamíferos, Kir3.1 (Nishida y MacKinnon, 2002) y Kir2.2 (Tao y cols., 2009), se ha podido avanzar en el conocimiento de los aspectos fundamentales de la estructura y del funcionamiento de estos canales de K^+ .

Los canales Kir están formados por cuatro subunidades 2TM/1P que se disponen simétricamente alrededor de un poro central (**Figura II.10**). Cada subunidad consta de dos hélices α (M1 y M2) conectadas por una secuencia de 30 aminoácidos (lazo P) en la que se encuentra el filtro de selectividad del canal (Doyle y cols., 1998). Esta región está formada por una secuencia de aminoácidos (T-X-G-Y(F)-G) muy conservada en todos los canales de K^+ (*K⁺ channel signature*).

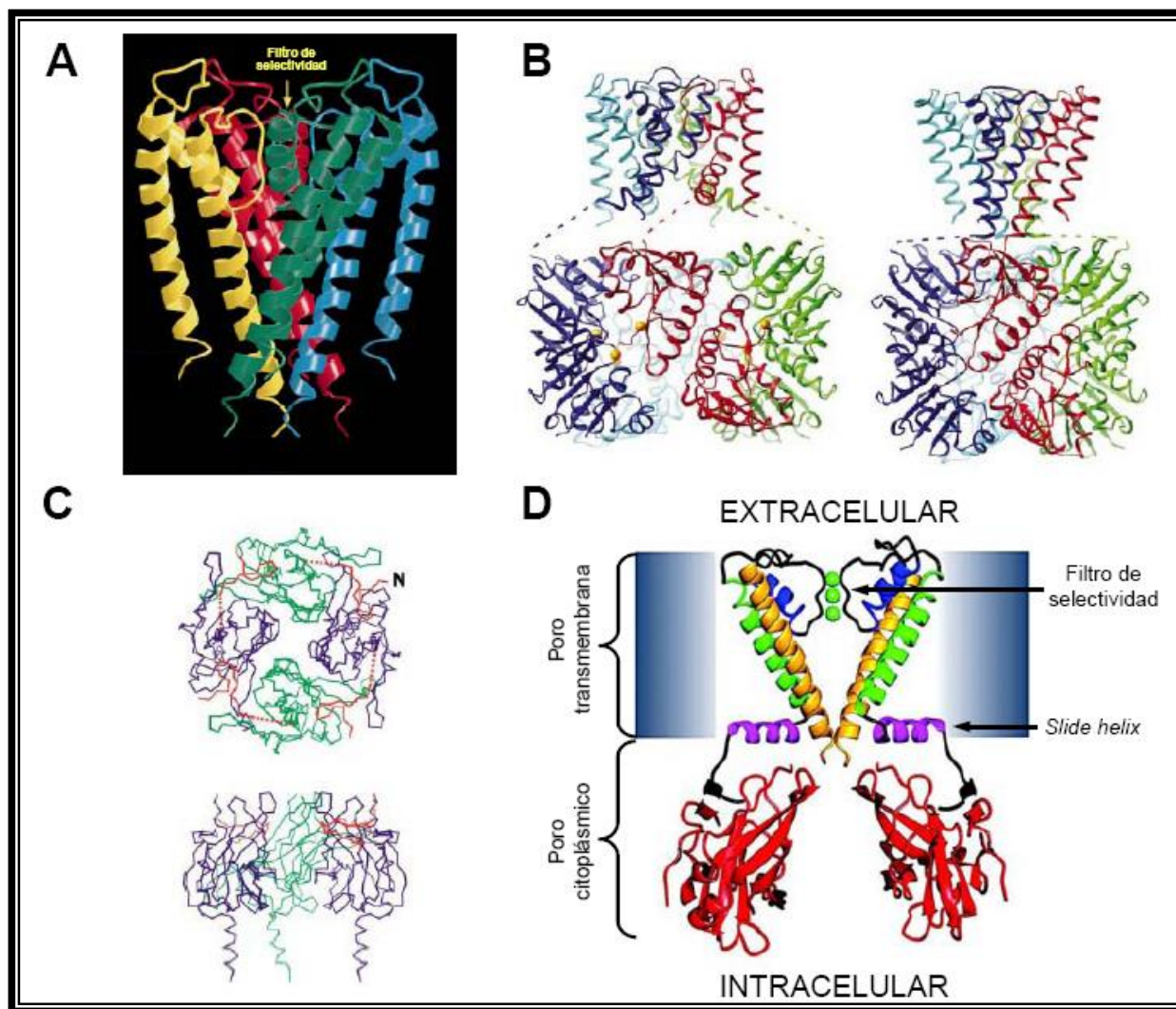


Figura II.10. Canales 2TM/1P. (A) Estructura del canal *KcsA* en una visión lateral del tetrámero. (B) Estructura cristalizada del canal *MthK* en el estado abierto (a la izquierda) y modelo hipotético de su configuración cerrada (a la derecha). (C) Estructura del dominio intracelular del canal Kir3.1 en una visión superior (desde la membrana hacia el citoplasma) (panel superior) y en una visión lateral (panel inferior). (D) Modelo de la estructura de dos de las subunidades que forman los canales Kir2 basado en la estructura cristalográfica del canal bacteriano KirBac1.1. Se pueden distinguir la *slide helix* (en rosa), los segmentos M1 y M2 (en verde y amarillo, respectivamente), el lazo P (en azul) y el dominio citoplásmico (en rojo). [Adaptadas de Doyle y cols., 1998 (A), Jiang y cols., 2002a (B), Nishida y MacKinnon, 2002 (C) y Kuo y cols., 2003 (D)]

Cabe destacar que estos canales carecen del aparato sensor del voltaje que sí poseen los canales de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ sensibles a voltaje. El dominio N-terminal y el voluminoso dominio C-terminal son citoplasmáticos. En el extremo amino terminal aparece una estructura de α -hélice (*slide helix*) que se dispone paralela a la membrana plasmática y que controla el movimiento de apertura del canal (Doyle y cols., 1998; Kuo y cols., 2003; Hibino y cols., 2010; Baronas y Kurata, 2014). La longitud del dominio citoplasmático de los canales Kir es, al menos, la misma que la de la porción transmembrana (**Figura II.10**), lo que hace que estos canales presenten un poro iónico con una longitud total (poro citoplasmático + poro transmembrana) que es aproximadamente el doble de la de otros canales de K^+ (≈ 60 Å) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005; Hibino y cols.,

2010). Además, este dominio citoplasmático se encuentra formando un tetrámero relativamente polar y con una carga neta negativa que explicaría ciertas características de la rectificación interna de estos canales.

2.3.1.c. Principales corrientes cardíacas generadas a través de los canales Kir

Dentro de la familia de canales Kir, las subfamilias Kir2, Kir3 y Kir6 son las que se expresan en el tejido cardíaco: los canales Kir2 participan en la formación de los canales que generan la I_{K1} (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), las subunidades Kir3.1 y Kir3.4 (pertenecientes al grupo de canales acoplados a proteínas G) forman el canal que genera la corriente activada por acetilcolina ($I_{K,ACh}$), responsable de los efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos observados tras la estimulación vagal (Yamada y cols., 1998; Stanfield y cols., 2002), y las subunidades Kir6 heteromerizan con el receptor de sulfonilureas (SUR) para formar los canales que generan la corriente sensible a ATP ($I_{K,ATP}$), responsable del acortamiento de la DPA que aparece durante la isquemia cardíaca (Nichols y cols., 1996; Seino y Miki, 2003).

I. La I_{K1}

La corriente rectificadora interna I_{K1} ejerce dos funciones principales sobre el PA cardíaco, tanto a nivel auricular como ventricular. Por un lado, al presentar una conductancia mucho mayor que cualquier otra corriente, es la responsable de controlar el potencial de reposo fijándolo a valores cercanos al E_K . Por otro lado, cuando se produce la despolarización, los canales van a mantenerse cerrados durante toda la fase de meseta, abriéndose a potenciales más negativos que -20 mV, haciendo que la I_{K1} contribuya también de esta manera a la parte final de la fase 3 de la repolarización (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

Tal y como hemos visto, las distintas morfologías del PA registradas en el corazón se deben a la diferente expresión de las corrientes iónicas, incluida la I_{K1} (Schram y cols., 2002). Dicha corriente es prácticamente inexistente en células del nodo SA, lo que le permite mantener un potencial de reposo relativamente despolarizado (-50 mV) y que éste no se mantenga estable durante la fase 4 (Schram y cols., 2002). Sin embargo, la I_{K1} sí que está presente tanto en la aurícula como en el ventrículo, aunque presenta diferencias significativas ya que la corriente registrada en miocitos ventriculares es entre 6-10 veces mayor que la auricular, lo que permite mantener el potencial de reposo más hiperpolarizado y una repolarización más rápida (Lopatin y Nichols, 2001; Dhamoon y Jalife, 2005).

Al aplicar un pulso hiperpolarizante, la amplitud de la I_{K1} alcanza un pico máximo de corriente con una cinética de activación muy rápida (1-2 ms) para, a continuación, disminuir ligeramente durante la aplicación del pulso, hasta alcanzar un nivel estable de corriente (**Figura II.12**). A potenciales más negativos que el E_K , se registra una corriente de entrada de K^+ de gran amplitud, mientras que a potenciales más positivos que el E_K , se registra una corriente de salida de K^+ de pequeña amplitud. Además, conforme el potencial aplicado se va haciendo más positivo, la amplitud de esta corriente de salida disminuye hasta hacerse cero debido al fenómeno de rectificación interna (**Figura II.11**).

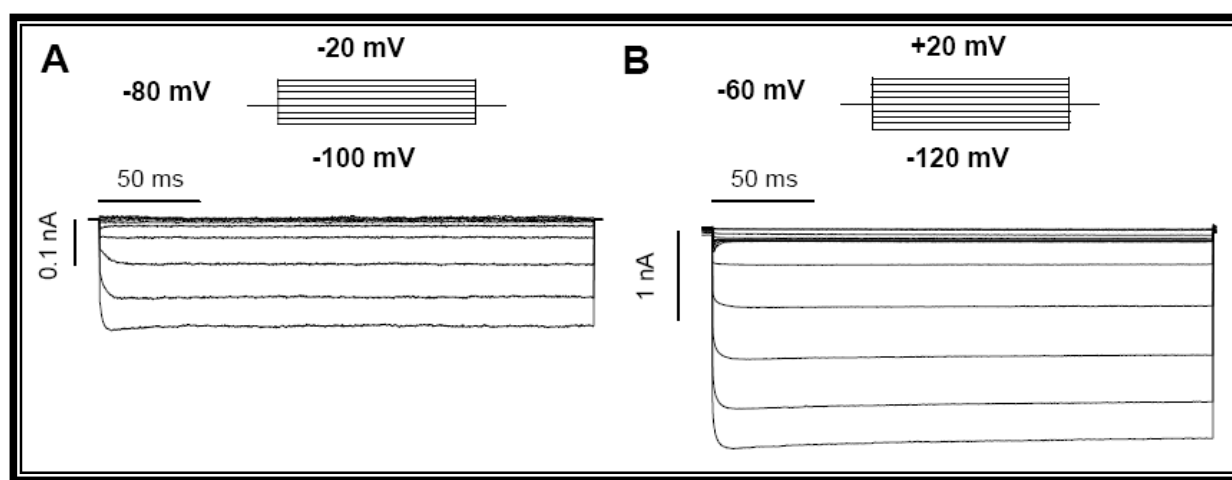


Figura. II.11. Registros de la I_{K1} generados en nuestro laboratorio. Familia de trazos representativa de la I_{K1} registrada en miocitos auriculares humanos (**A**) y de la $I_{Kir2.1}$ registrada en células CHO transfectadas transitoriamente con la subunidad Kir2.1 (**B**) tras la aplicación de los protocolos mostrados en la parte superior, respectivamente.

I.a. Composición de los canales que generan la I_{K1}

Hasta la fecha se han clonado 5 miembros de la familia Kir2 (Kir2.1, 2.2, 2.3, 2.4 y 2.6) en mamíferos. La expresión de los canales Kir2.4 en el corazón es mínima (sólo se ha demostrado su presencia en las neuronas que inervan el miocardio) (Liu y cols., 2001). La expresión de Kir2.6 únicamente se ha demostrado en músculo esquelético (Ryan y cols., 2010), y la de Kir2.5 no se ha demostrado hasta la fecha en mamíferos (Hassinen y cols., 2008).

En general, en todas las especies estudiadas, menos en el ratón (Lomax y cols., 2003), la densidad de la I_{K1} es mucho mayor en el tejido ventricular que en el auricular (Shah y cols., 1987; Giles e Imaizumi, 1988; Varro y cols., 1993; Melnyk y cols., 2002; Dhamoon y cols., 2004). Dentro de los canales que generan dicha corriente, la composición varía según la especie y el tipo celular estudiado y según la localización en la membrana de dichos canales (Zaritsky y cols., 2001; Kubo y cols., 2005; Gaborit y cols., 2007). Se ha tratado de averiguar dicha composición atendiendo a las diferencias que presentan cada uno de los miembros de la subfamilia Kir2 respecto a propiedades

farmacológicas u otras propiedades como la conductancia, la sensibilidad al Ba^{2+} y al pH o la “cinética de activación” (Liu y cols., 2001; Muñoz y cols., 2007). Gaborit y cols. demostraron que la expresión de canales Kir2.3 es máxima en el tejido auricular humano mientras que es residual en el tejido ventricular. Por el contrario, la expresión de canales Kir2.1 en el tejido ventricular humano es muy alta lo que sugiere que en él los canales Kir2.1 forman homotetrámeros (Gaborit y cols., 2007). Asimismo, dichos autores encontraron diferencias significativas en el patrón de expresión entre el epicardio y el endocardio del lado derecho del corazón para las subunidades Kir2.1 (expresión más elevada en el endocardio derecho), Kir2.2 (expresión más elevada en el epicardio derecho) y Kir2.3 (expresión más elevada en el endocardio derecho), así como diferencias en la expresión de las diferentes subunidades Kir2.x en las fibras de Purkinje ($\text{Kir2.1} \sim \text{Kir2.3} > \text{Kir2.2}$), en el ventrículo derecho ($\text{Kir2.1} > \text{Kir2.2} \sim \text{Kir2.3}$), en la aurícula derecha ($\text{Kir2.3} > \text{Kir2.2} > \text{Kir2.1}$) y en la aurícula izquierda ($\text{Kir2.2} > \text{Kir2.3} > \text{Kir2.1}$) (Gaborit y cols., 2007). En el año 2010, nuestro grupo (Caballero y cols., 2010a) demostró que la I_{K1} ventricular de cobayo está generada mayoritariamente por canales formados por cuatro subunidades de Kir2.1, mientras que la I_{K1} auricular está generada por heterotetrámeros de Kir2.x. A pesar de que tanto en aurícula como en ventrículo se encontró la presencia de ARNm de las tres subunidades, la expresión de Kir2.1 en tejido cardiaco de cobayo fue mayor en ventrículo que en aurícula, al igual que ocurre en humanos (Liu y cols., 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010; Caballero y cols., 2010a).

II. La $I_{K,ATP}$

En el corazón, la corriente rectificadora $I_{K,ATP}$ juega un importante papel durante la isquemia miocárdica y en el preconditionamiento isquémico (Seino y Miki, 2003; Nerbonne y Kass, 2005). Esta corriente se inhibe por ATP intracelular y se activa por el ADP-Mg, por lo que la actividad del canal está regulada por el cociente ADP/ATP (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003).

El canal K_{ATP} ventricular es el resultado de la asociación de 4 subunidades α Kir6.2 con 4 subunidades auxiliares SUR2A (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016), mientras que en la aurícula parece que podrían asociarse subunidades Kir6.2 también a subunidades SUR1 (Nichols y cols., 2013; Foster y Coetzee, 2016). Las subunidades SUR son miembros de la familia de proteínas de membrana del tipo ABC (*ATP binding cassette*) que confieren diferentes propiedades electrofisiológicas y farmacológicas a las subunidades α Kir6 a las que regulan (Nichols y cols., 2013). Se ha descrito que, en el sistema de conducción, los canales K_{ATP} podrían estar formados también por subunidades Kir6.1 (Bao y cols., 2011).

Las subunidades α Kir6 están formadas por 2 segmentos TM (M1 y M2) y son las que confieren al canal la capacidad de ser regulado por el ATP (Tucker y cols., 1996). Por su lado, las subunidades auxiliares SUR2A tienen 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos, NBD1 y NBD2 (*Nucleotide Binding Domain*), localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 y en la región C-terminal, respectivamente (**Figura II.12**) (Conti y cols., 2001; Seino y Miki, 2003). Estas subunidades son las que confieren al canal la sensibilidad al ADP, a las sulfonilureas y a los “activadores” del canal (Yokoshiki y cols., 1998; Moreau y cols., 2000; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016). La hidrólisis del ATP en los dominios NBD de las subunidades SUR2A produce la activación del canal y permite el paso de K^+ a través de la subunidad α Kir6.2 (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003).

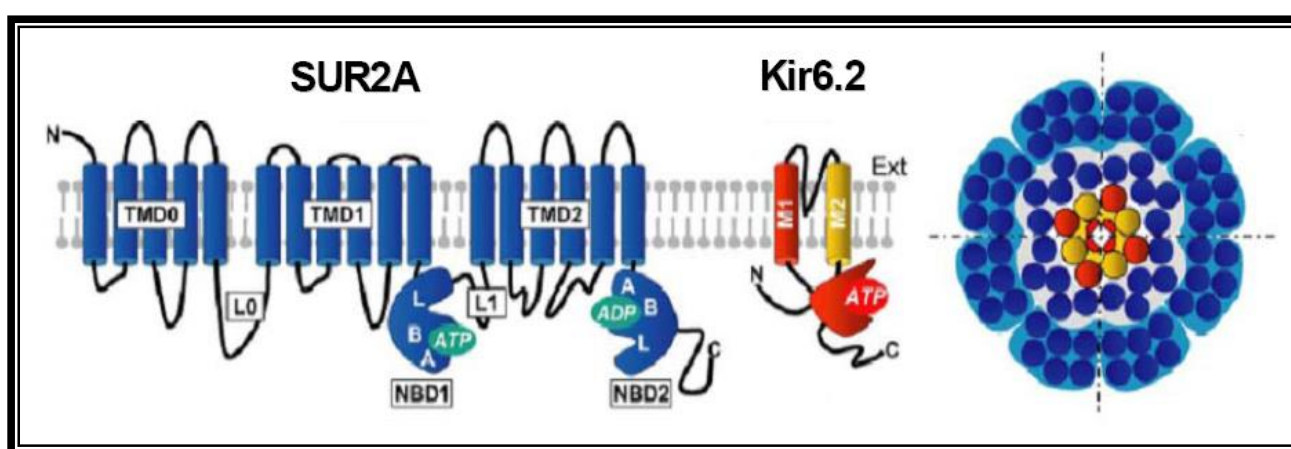


Figura II.12. Estructura de los canales K_{ATP} . Modelo estructural del canal K_{ATP} cardíaco formado por 4 subunidades Kir6.2 (en rojo y amarillo) y 4 subunidades SUR2A (en azul). Cada subunidad Kir6.2 está formada por 2 segmentos TM en α -hélice y un largo dominio citoplásmico con el sitio de unión para el ATP. Cada subunidad SUR2A contiene 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 (L1) y en el extremo C-terminal. [Adaptada de Moreau y cols., 2005]

Los canales K_{ATP} permiten acoplar el E_m al metabolismo celular (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016) puesto que son regulados por el cociente ATP/ADP. La $I_{K,ATP}$ se inhibe cuando aumenta el ATP intracelular, mientras que se activa por el ADP (Yellen, 2002). Sin embargo, diversos factores como otros nucleótidos difosfato, el lactato o algunos radicales libres derivados del O_2 pueden producir la desensibilización del canal, es decir, la pérdida de su capacidad para ser regulado por el ATP (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003; Foster y Coetzee, 2016).

III. La $I_{K,ACh}$

En el corazón humano, los canales que generan la $I_{K,ACh}$ (K_{ACh}) están formados por el ensamblaje de subunidades Kir3.1 y Kir3.4, que forman una estructura tetramérica siguiendo una estequiometría 2:2 (Dascal y cols., 1993; Krapivinsky y cols., 1995; Yamada y cols., 1998), mientras que la presencia de Kir3.2 y Kir3.3 es mínima o incluso nula (Wickman y cols., 1998). Se ha postulado que la subunidad Kir3.1 requiere de la presencia de la subunidad Kir3.4 para formar el canal funcional (Kennedy y cols., 1996; Yamada y cols., 1998).

La densidad de los canales K_{ACh} es muy alta en las células marcapaso de los nodos SA (donde regula la frecuencia cardiaca) y AV (Mark y Herlitze, 2000). Además, juega un papel importante en el control de la DPA en el tejido auricular, donde la densidad de la $I_{K,ACh}$ es 6 veces mayor que en el ventricular (Schram y cols., 2002). La ACh estimula los receptores muscarínicos M_2 y produce la apertura de los canales los cuales generan una corriente que se caracteriza principalmente por una activación de cinética sigmoideal dependiente de tiempo y de la dosis de agonista, por lo que se tardan cientos de milisegundos en alcanzar la amplitud máxima de la corriente (Breitwieser y Szabo, 1988). Posteriormente, y aunque la ACh esté todavía presente, se produce la disminución gradual de la corriente hasta que se alcanza un nivel cercano al estado estable, denominado “*quasi-steady-state*” (Qss) (Kurachi y cols., 1987).

La activación de la $I_{K,ACh}$ hiperpolariza el E_m y reduce la frecuencia de disparo de las células del nodo SA, lo que explica su efecto cronotrópico negativo. Además, reduce la frecuencia de disparo y la velocidad de conducción a través del nodo AV, lo que explica por qué la estimulación vagal puede parar las taquiarritmias por reentrada intranodal (Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004).

2.3.2. Canales 6TM/1P

Los canales 6TM/1P (**Figura II.8A**) agrupan a los canales de K^+ activados por voltaje (canales K_v) y a los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (canales K_{Ca}), que presentan un segmento TM adicional (S0) en el extremo N-terminal. Tras el clonaje del canal *Shaker* (Jan y cols., 1983) se identificaron otras tres familias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales K_v a las que se denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal*. En mamíferos, estas cuatro familias se corresponden con las subfamilias K_v1 (*Shaker*), K_v2 (*Shab*), K_v3 (*Shaw*) y K_v4 (*Shal*). Hasta la fecha, se han descrito doce subfamilias de subunidades α K_v (K_v1 a K_v12), con una homología aminoacídica de $\approx 70\%$ dentro de una misma familia y de $\approx 40\%$ entre diferentes familias (Gutman y cols., 2005).

Además, la diversidad funcional de los canales Kv se ve aumentada por factores como: a) la formación de heterotetrámeros (Christie y cols., 1990; Ruppersberg y cols., 1990; Covarrubias y cols., 1991; MacKinnon, 1991); b) la presencia de miembros de las familias Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9, que no forman canales funcionales por sí solos sino que son subunidades moduladoras que se ensamblan con subunidades Kv2 formando heterotetrámeros (Gutman y cols., 2005); c) la presencia de proteínas auxiliares, que modifican la función y/o la expresión en la membrana de los canales Kv (Gutman y cols., 2005); d) modificaciones postranscripcionales (*splicing* alternativo), que dan lugar a diferentes isoformas de los canales a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997); y e) modificaciones postraduccionales, que regulan la función de muchos canales Kv mediante fosforilación, ubiquitinización, palmitoilización, nitrosilación, etc (Grandi y cols., 2016; Chiamvimonvat y cols., 2016).

2.3.2.a. Estructura de los canales Kv

La primera estructura cristalográfica de un canal Kv de mamífero se resolvió en 2005. Era el canal formado por la subunidad α Kv1.2 y la subunidad auxiliar Kv β 2 de cerebro de rata (Long y cols., 2005a y b), que venía a confirmar los modelos que se habían propuesto anteriormente para los canales Kv tras la resolución de otros canales de K⁺ no dependientes de voltaje (Doyle y cols., 1998; Zhou y cols., 2001) y de canales Kv bacterianos (Sokolova y cols., 2001; Jiang y cols., 2003a y b). La estructura resuelta se correspondía con la de un canal tetramérico en estado abierto cuyas dimensiones eran de 135x95x95 Å, con un poro de ≈ 12 Å de diámetro (**Figura II.13**).

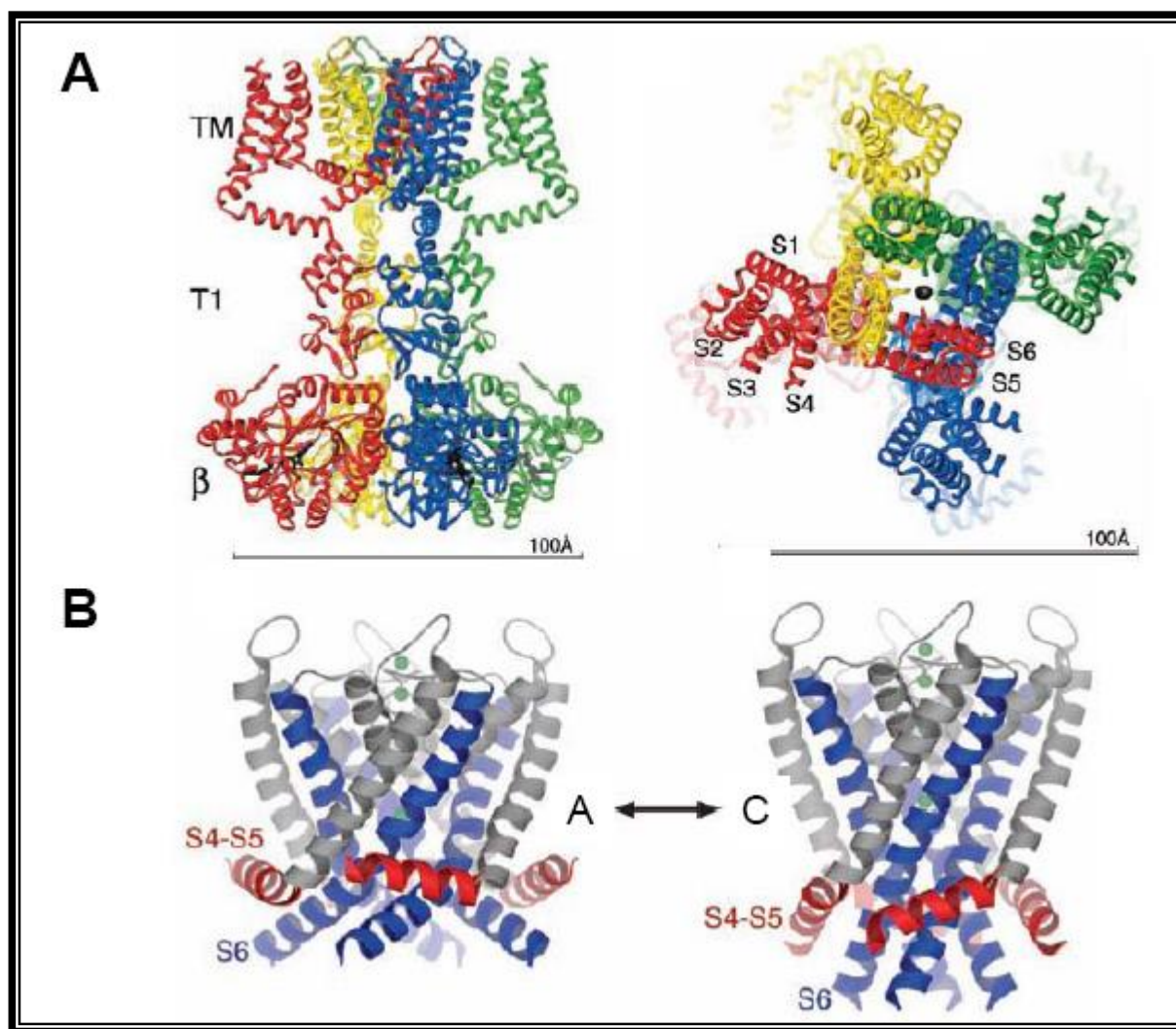


Figura II.13. Estructura del complejo formado por la subunidad α Kv1.2 y la subunidad auxiliar β 2. (A) Vistas lateral (**izquierda**) y superior desde el lado extracelular (**derecha**) del complejo Kv1.2/Kv β 2. (B) Modelo propuesto del canal Kv1.2, donde se observa la diferente posición del lazo S4-S5 en los estados abierto (**izquierda**) y cerrado (**derecha**). [Adaptadas de Long y cols., 2005a (A) y 2005b (B)]

Existen dos patrones fundamentales de organización estructural en la familia de canales Kv: los canales Kv1 a Kv4 presentan una estructura denominada T1 o “dominio NAB o dominio de tetramerización” en el extremo N-terminal que se ha demostrado fundamental para el reconocimiento y ensamblaje entre subunidades α así como responsable de la interacción con subunidades β y otras proteínas (**Figura II.14A**), mientras que los canales Kv7 y Kv10 - Kv12 no presentan ese dominio T1, aunque presentan un dominio carboxi-terminal localizado en el núcleo central del canal que podría desempeñar una función similar (**Figura II.14B**) (Shen y Pfaffinger, 1995; Xu y cols., 1995; Kreusch y cols., 1998; Yellen, 2002; Barros y cols., 2012).

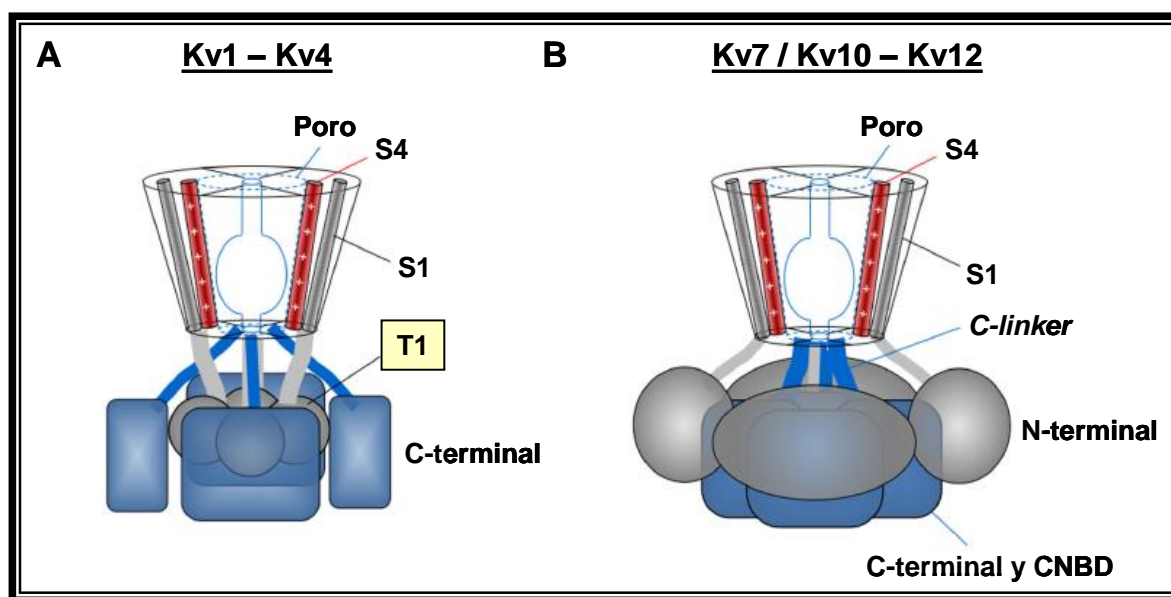


Figura II.14. Organización estructural de las subunidades α de los canales Kv. (A) Representación de los canales Kv1 – Kv4 con el dominio T1 situado en la región citoplásmica de manera central justo debajo del dominio del poro y rodeado por los extremos C-terminales de cada subunidad. (B) Representación de la estructura de los canales Kv7 y Kv10 – Kv12 en la que ahora son los extremos C-terminales los que se sitúan de manera central en la cara citoplásmica justo debajo del poro, rodeados por los extremos N-terminales de cada subunidad. CNBD: Dominio de unión a nucleótidos cíclicos (*Cyclic Nucleotide Binding Domain*). [Adaptada de Barros y cols., 2012]

I. La subunidad α

En los canales Kv, cada subunidad α consta de 6 segmentos TM (S1 a S6) con estructura de hélice α y conectados entre sí por secuencias hidrofílicas no conservadas. Los S1 a S4 constituyen el sensor de voltaje mientras que los segmentos S5 y S6 forman el poro iónico o dominio del poro. La secuencia que conecta el S5 y el S6 se denomina región o lazo P, está formada por 20 aminoácidos, y se introduce en la membrana (1 nm) tapizando la parte extracelular del poro iónico (**Figura II.15**) (Liman y cols., 1991; MacKinnon, 1991; Yellen y cols., 1991; MacKinnon, 2003; Whicher y cols., 2016).

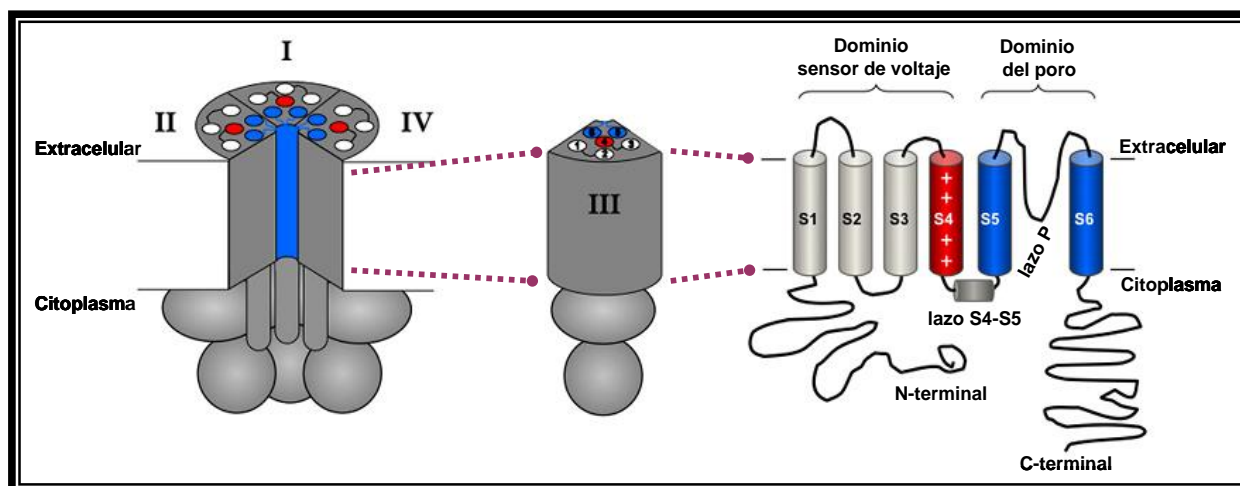


Figura II.15. Representación esquemática de la organización tetramérica de las subunidades α de los canales Kv. En el centro de la figura se visualiza un esquema del modelo de plegamiento de una de las cuatro subunidades. Cada subunidad se compone principalmente de 6 segmentos TM (S1-S6), el lazo P y el lazo S4-S5, y los dominios N y C terminales (esquema parte derecha de la figura). [Adaptada de Barros y cols., 2012]

- *Dominio del poro y filtro de selectividad*

Para formar un canal funcional es necesario el ensamblaje de cuatro subunidades α , las cuales se van a disponer de tal forma que la boca externa del poro está formada por el lazo P, mientras que el segmento S6 y la región peptídica que une los segmentos S4 y S5 forman la boca interna del poro (**Figura II.15**).

La región que une los segmentos S5 y S6 es el sitio de unión de muchas toxinas y el segmento de unión de S4-S5 forma parte del receptor para la partícula de inactivación (Isacoff y cols., 1991). Gracias a estudios de mutagénesis dirigida en canales, se ha podido demostrar que en el poro iónico se encuentran los lugares de unión para el tetraetilamonio (TEA) (Yellen y cols., 1991; Choi y cols., 1993), fármacos antiarrítmicos como la quinidina (Yeola y cols., 1996), o anestésicos locales como la bupivacaína (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997) y la benzocaína (Caballero y cols., 2002).

El radio de un átomo de K^+ es de 1.33 \AA , mientras que el de un átomo de Na^+ es de 0.95 \AA . Pese a esta pequeña diferencia en el radio atómico, los canales de K^+ son capaces de discriminar entre ambos iones con una selectividad superior a 1000 veces para el K^+ , con una velocidad de conducción ≈ 108 iones/s. El filtro de selectividad del canal se encuentra en una región del lazo P formada por los aminoácidos (T/S)xxTxGYG, denominada “secuencia de selectividad del K^+ ” y que está altamente conservada en todos los canales de K^+ (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y cols., 1994). A excepción de los aminoácidos que forman el filtro de selectividad, los aminoácidos que constituyen las paredes del canal son hidrófobos, minimizándose así la

interacción electrostática del K^+ con el canal y creándose una ruta de baja resistencia desde el citoplasma hasta el filtro de selectividad que permite que el ion K^+ hidratado pase fácilmente desde la solución intracelular hasta la cavidad central, donde alcanza una elevada concentración (≈ 2 M) (Zhou y cols., 2001).

Una vez allí, el ion K^+ ha de atravesar el estrecho paso que forma el filtro de selectividad y para ello ha de perder sus capas de hidratación. La entrada de un ion K^+ en el filtro de selectividad crea un dipolo, de manera que un ion K^+ dispone de cuatro sitios de unión a lo largo del filtro de selectividad, formados por los átomos de oxígeno de los carbonilos de los residuos TxGYG. Para compensar el coste energético que supone la deshidratación del ion al atravesar el filtro, los átomos de oxígeno hacen las veces de moléculas de agua de manera que, durante su paso a través del filtro de selectividad, los iones K^+ se encuentran rodeados de ocho átomos de oxígeno, en una disposición similar a la que adoptan las moléculas de agua que rodean a los iones de K^+ en el medio acuoso (**Figura II.16**) (Roux y MacKinnon, 1999; MacKinnon, 2003).

El filtro de selectividad presenta una longitud de 12 Å, de manera que a lo largo del filtro normalmente se encuentran 2 iones K^+ (≈ 2.7 Å), separados por una molécula de agua, a una distancia de 3.5 Å (Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y MacKinnon, 2003). La presencia de un único ion K^+ permitiría una fuerte interacción de éste con los aminoácidos del filtro, pero la entrada de un segundo ion produce una repulsión electrostática mutua, que compensa la atracción del filtro de selectividad y produce la salida del ion K^+ hacia el espacio extracelular (Doyle y cols., 1998).

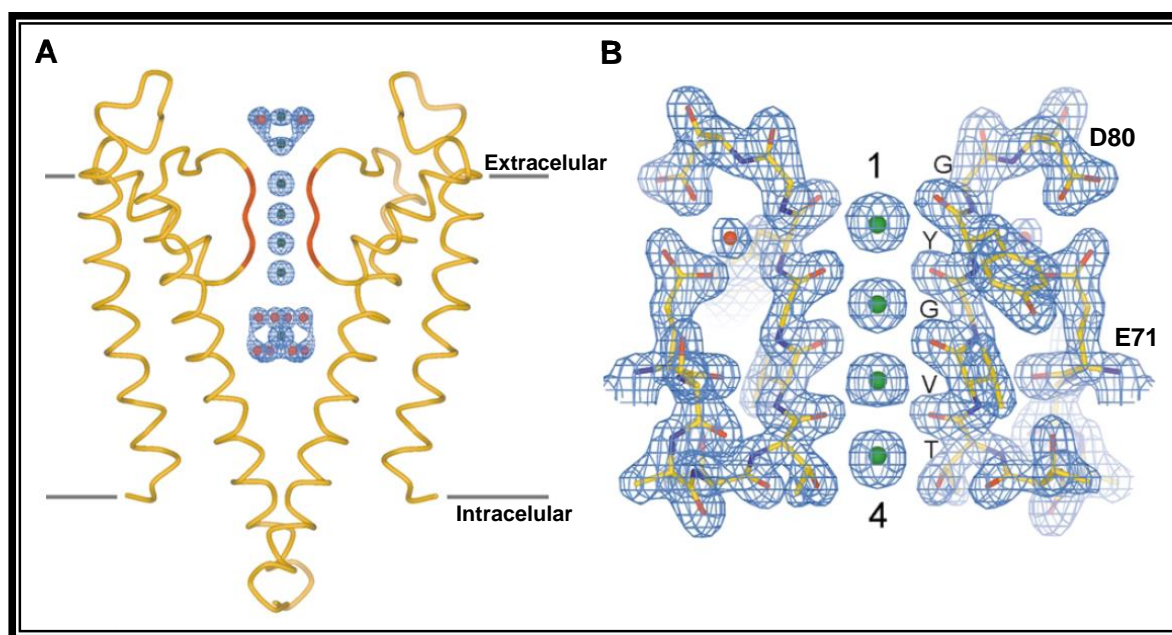


Figura II.16. Representación esquemática del filtro de selectividad de los canales de K^+ . (A) Representación esquemática de dos de las subunidades que forman el canal *KcsA* en una vista lateral, con la región que forma el filtro de selectividad señalada en rojo. Los sitios de unión de los iones K^+ se representan como esferas verdes y las moléculas de agua como esferas rojas. (B) Detalle de la secuencia del filtro de selectividad del canal *KcsA* incluyendo los

aminoácidos E71 al D80 que rodean el filtro. Los sitios de unión de los iones K^+ se representan como esferas verdes y están numerados del 1 al 4 desde la región extracelular hacia la intracelular. [Adaptadas de Zhou y MacKinnon, 2003]

- *Sensor de voltaje*

La principal característica de los canales Kv consiste en que son capaces de detectar los cambios de voltaje producidos en la membrana y acoplar esta señal a su funcionamiento (Armstrong, 1974; Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000 y 2002). La dependencia de voltaje de los canales de K^+ se debe a la presencia en su estructura de un sensor de voltaje que está formado por los cuatro primeros segmentos del canal (S1-S4). El segmento S4 contiene cuatro o más residuos cargados positivamente (argininas y lisinas), cada uno de los cuales se encuentra separado por dos residuos hidrofóbicos, que se recolocan en la membrana cuando el E_m varía. Así, durante la apertura y cierre del canal, se genera un movimiento de cargas de $\approx 12-13 e_0$ a través del campo eléctrico transmembrana (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995) que resulta en una corriente denominada “corriente de *gating*”, la cual puede ser medida experimentalmente (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974). Diversos estudios han demostrado que mutaciones que neutralizan los aminoácidos cargados del S4 desplazan el valor del punto medio de la curva de activación de los canales Kv, lo que indica que el S4 juega un importante papel en el cambio conformacional que conlleva la apertura de éstos (Liman y cols., 1991; Papazian y cols., 1991).

Dos son los principales modelos de movimiento del sensor propuestos: un modelo “de rotación”, con la exposición de determinados residuos del S4 en ranuras acuosas en las que el campo eléctrico está muy confinado (**Figura II.17A**), y un modelo “de inclinación” o “modelo de remo”, que implica grandes desplazamientos del sensor a través del campo transmembrana (**Figura II.17B**) (Jiang y cols., 2003a y b; Tombola y cols., 2005).

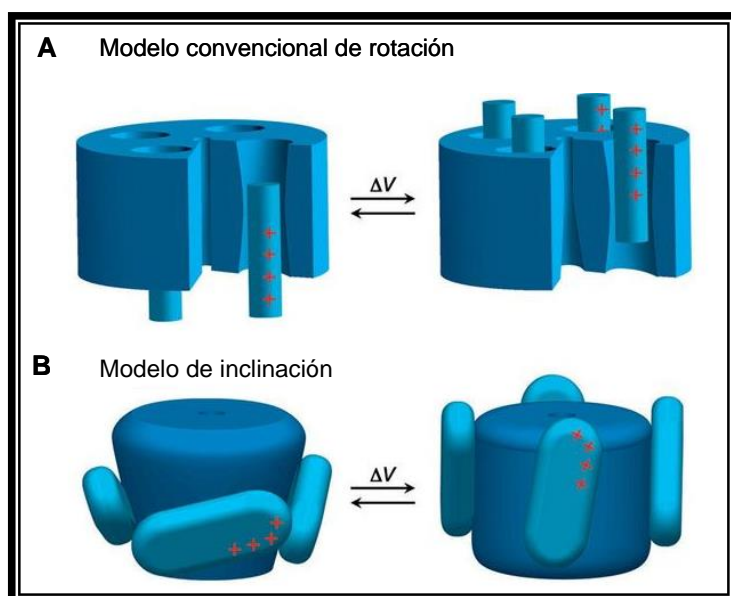


Figura II.17. Modelos de movimiento del sensor de voltaje de los canales Kv. (A) Modelo convencional en el que el movimiento de cargas se realiza a través del núcleo proteico del canal mediante un movimiento de traslación y/o rotación del S4. (B) Modelo en el que el sensor de voltaje se encuentra sumergido en los lípidos de la membrana, produciendo el desplazamiento de cargas a través del campo eléctrico. [Adaptadas de Jiang y cols., 2003a]

II. Subunidades auxiliares

El ensamblaje de 4 subunidades α es suficiente para formar un canal funcional que genere una corriente iónica. Sin embargo, la presencia de subunidades auxiliares aumenta la diversidad funcional de los canales Kv (**Figura II.18 y Tabla II.8**) y regula funciones como el *gating*, la expresión y/o el tráfico hacia la membrana de éstos (**Tabla II.8**). Además, estas subunidades pueden servir como sitio de unión de moléculas adaptadoras o de ligandos exógenos/endógenos.

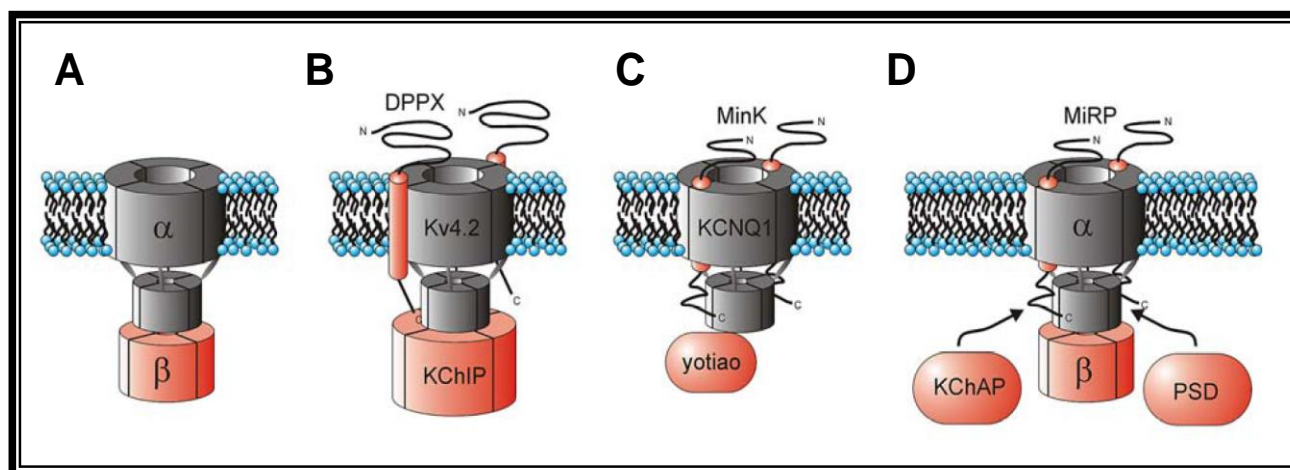


Figura II.18. Dibujo esquemático de diversos tipos de subunidades auxiliares de canales iónicos y su posición respecto al poro. Las subunidades α aparecen en gris y las subunidades β en rojo. **(A)** Ensamblaje de 4 subunidades α Kv a través del extremo N-terminal con 4 subunidades Kv β citosólicas. **(B)** Interacción del canal Kv4.2 con un complejo de 4 subunidades citoplásmicas KChIP. Se observa también la asociación de la subunidad DPPX con la subunidad α . **(C)** Asociación de 4 subunidades Kv7.1 con 2 subunidades minK, así como la formación del complejo macromolecular con la proteína adaptadora yotiao. **(D)** Complejo molecular formado por una subunidad α Kv, las subunidades auxiliares Kv β , MiRP y KChAP y una proteína de densidad pos-sináptica (PSD). [Adaptadas de McCrossan y Abbott, 2004]

Familia	Subunidad β	Gen	Función	Subunidad α
Kv β	Kv β 1* Kv β 2* Kv β 3	<i>KCNAB1</i> <i>KCNAB2</i> <i>KCNAB3</i>	-Inducir una rápida inactivación de la corriente -Efecto chaperona para estabilizar la expresión de los canales en la membrana ¹	Kv1, Kv2 y Kv4 ²
minK y péptidos relacionados (KCNE)	minK* MirP1* MirP2* MirP3* MiRP4	<i>KCNE1</i> <i>KCNE2</i> <i>KCNE3</i> <i>KCNE4</i> <i>KCNE5</i>	Regulación de las características electrofisiológicas de la corriente	Kv7.1 (también Kv11.1 y Kv4.3) ³ Kv11.1, Kv7.1, Kv4.2 y Kv4.3 ⁴
KChAP	KChAP*	<i>PIAS3</i>	Apoptosis ⁵	Kv1, Kv2 y Kv4 ⁶
KChIP	KChIP1 KChIP2* KChIP3 KChIP4.2 KChIP4.3	<i>KCNIP1</i> <i>KCNIP2</i> <i>KCNIP3</i> <i>CSEN</i> <i>KCNIP4</i>	Regulación de la cinética de inactivación y/o de recuperación de la inactivación de los canales ⁷	Kv4.2 y Kv4.3 ⁸
DPP	DPP6* DPP10*	<i>DPP6</i> <i>DPP10</i>	Regular la cinética y el tráfico a membrana de los canales ^{9,10}	Kv4 ^{9,10}

Tabla II.8. Principales subunidades auxiliares de los canales Kv. *Subunidades que se expresan en el miocardio.

¹(Nakahira y cols., 1996) ²(Aimond y cols., 2005) ³(Sanguinetti y cols., 1996) ⁴(McCrossan y Abbott, 2004; Delpón y cols., 2008) ⁵(Wible y cols., 2002) ⁶(An y cols., 2000; Wang y cols., 2007) ⁷(An y cols., 2000; Wang y cols., 2007) ⁸(An y cols., 2000) ⁹(Kin y cols., 2001; Nadal y cols., 2003) ¹⁰(Radicke y cols., 2006).

2.3.2.b. La inactivación de los canales Kv

El estado inactivo es un estado no conductor que la mayoría de los canales Kv alcanzan tras su activación, aunque puede alcanzarse desde el estado cerrado o sin que el canal se abra (Rasmusson y cols., 1998; Kurata y Fedida, 2006). Tanto la inactivación como la recuperación de la misma son fundamentales para determinar la contribución de cada una de las corrientes de K⁺ a la repolarización cardíaca. Sin embargo, no existe un único mecanismo responsable de la inactivación, sino que es un proceso que presenta propiedades diferentes dependiendo del canal estudiado.

La inactivación tipo-N se conoce como “modelo de la bola y la cadena”, ya que una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos del extremo N-terminal (bola), que se encuentra unida al canal a través del dominio formado por el resto de aminoácidos hasta el segmento S1 (cadena), ocluye el poro intracelular del canal e impide el paso de los iones (**Figura II.19**) (Zagotta y cols., 1990; Isacoff y cols., 1991; MacKinnon y cols., 1993; Gómez-Lagunas y Armstrong, 1995; Lee y cols., 1996). Este mecanismo es un proceso de inactivación muy rápido (1-10 ms), por lo que también se conoce como “inactivación rápida” y se produce en canales de la familia *Shaker* (Kv1.1 y Kv1.4),

Shal (Kv4.2 y Kv4.3) y *Shaw* (Kv3.1-3.4) (Coetzee y cols., 1999). Se ha determinado que existen alrededor de 10 aminoácidos hidrofóbicos seguidos de una serie de aminoácidos con una carga neta positiva que determinan la inactivación tipo-N. Gracias a estos datos se ha postulado que los residuos hidrofóbicos del dominio de inactivación pueden interactuar directamente con regiones hidrofóbicas del canal, probablemente en la región que une los segmentos S4 y S5 (Isacoff y cols., 1991). Pero no siempre la inactivación tipo-N se produce a través de la secuencia descrita, ya que existen subunidades reguladoras, como las subunidades β , que pueden interaccionar con canales, como en el caso del canal Kv1.1, dando lugar a la inactivación tipo-N de los mismos (MacKinnon y cols., 1993; Rettig y cols., 1994).

Una importante característica de este tipo de inactivación es su sensibilidad al bloqueo por TEA y por pancuronio, sólo cuando son aplicados en la cara intracelular del poro (Choi y cols., 1991).

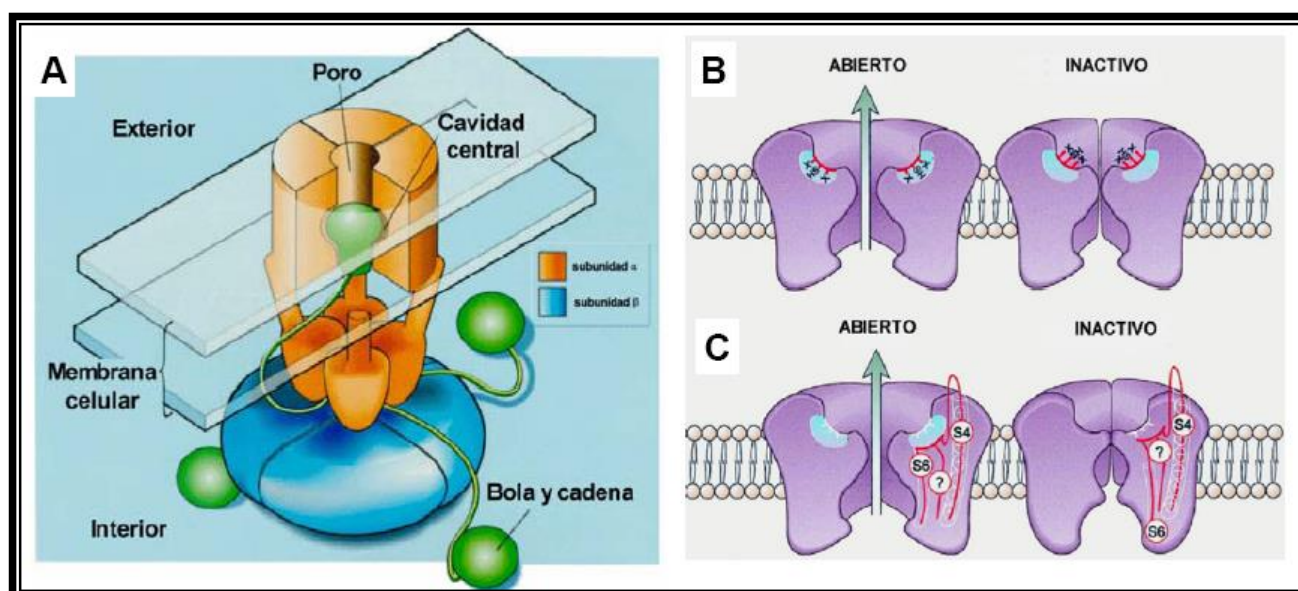


Figura II.19. Modelos de inactivación de los canales Kv. (A) Modelo de “la bola y la cadena”. (B-C) Modelo de inactivación tipo-C: cambios conformacionales en la boca externa del poro asociados a la inactivación tipo-C (B) y cambios conformacionales adicionales que tienen lugar durante este tipo de inactivación (C), asociados fundamentalmente al S6. [Adaptadas de Aldrich, 2001 (A) y Rasmusson y cols., 1998 (B-C)]

La eliminación de la inactivación rápida tipo-N deja al descubierto la presencia de un proceso inactivante lento al que se denominó inactivación tipo-C, puesto que inicialmente se pensó que dependía específicamente del extremo C-terminal del canal (**Figuras II.19B y C**) (Choi y cols., 1991; Hoshi y cols., 1991). Posteriormente se demostró que esta inactivación depende de cambios conformacionales en la boca externa del poro que implican también la participación del filtro de selectividad (López-Barneo y cols., 1993; Rasmusson y cols., 1998). La inactivación tipo-C se diferencia de la tipo-N en que es un mecanismo en el que las cuatro subunidades del canal actúan de

manera cooperativa, mientras que los dominios inactivantes tipo-N actúan independientemente (Ogielska y cols., 1995; Panyi y cols., 1995). La inactivación tipo-C, al igual que la inactivación tipo-N, es independiente de voltaje a potenciales a los que la activación es completa, lo que sugiere que son mecanismos acoplados a ésta (Hoshi y cols., 1990; Rasmusson y cols., 1995). Además, la recuperación de ambos tipos de inactivación es voltaje dependiente, debido al descenso del segmento S4 (Rasmusson y cols., 1995) de manera similar al mecanismo propuesto para el modelo de “bola y cadena” (Rasmusson y cols., 1995). Sin embargo, una de las principales diferencias con respecto a la inactivación tipo-N es que la de tipo-C no es sensible a la perfusión intracelular con TEA (Hoshi y cols., 1991; López-Barneo y cols., 1993) y es sensible a la concentración y naturaleza del catión permeable en el medio extracelular (MacKinnon y Yellen, 1990). La cinética de la inactivación tipo-C se retrasa al aumentar la $[K^+]_e$, debido a que la interacción del K^+ con un sitio de alta afinidad situado en la cara externa del poro iónico del canal impide que se produzca el cierre de la boca de éste (López-Barneo y cols., 1993).

2.3.2.c. Principales corrientes generadas a través de los canales Kv que intervienen en el PA cardíaco

Gracias a estudios realizados con la técnica de *patch-clamp* en miocitos auriculares y ventriculares, se han identificado al menos 4 corrientes de K^+ generadas a través de canales Kv implicadas en el desarrollo del PA cardíaco: la I_{to1} , la I_{Kur} , la I_{Kr} y la I_{Ks} (Tabla II.9).

Corriente iónica	Subunidad α	Gen	Localización cromosómica
I_{to1}	Kv4.3 Kv1.4 Kv4.1 Kv4.2	KCND3 KCNA4 KCND1 KCND2	1p13.2 11p14.3-15.2 Xp11.23 7q31
I_{Kur}	Kv1.5	KCNA5	12p13.3
I_{Ks}	Kv7.1 (KvLQT1)	KCNQ1	11p15.5
I_{Kr}	Kv11.1	KCNH2	7q35-36

Tabla II.9. Diferentes subunidades α forman los canales Kv que generan las principales corrientes de K^+ implicadas en el desarrollo del PA cardíaco. En la tabla también se detallan los genes que codifican cada una de las subunidades así como su correspondiente localización cromosómica en el humano. [Adaptada de Tamargo y cols., 2004]

I. La I_{to}

La corriente transitoria (I_{to}) está formada en realidad por dos componentes bien diferenciados, la I_{to1} y la I_{to2} , donde sólo la I_{to1} es una corriente de K^+ sensible a 4-aminopiridina (4-AP) e independiente de Ca^{2+} , mientras que la I_{to2} es una corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} y de menor magnitud que la I_{to1} (Siegelbaum y cols., 1977; Kenyon y Gibbons, 1979; Coraboeuf y Carmeliet, 1982; Hiraoka y Kawano, 1989). La I_{to1} es responsable de la rápida repolarización durante la fase 1, por lo que determina la altura y la duración de la fase de meseta del PA (Nerbonne, 2000; Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010).

La I_{to1} se activa (alcanza su máxima amplitud en 5-20 milisegundos) y se inactiva rápidamente (**Figura II.20**), siendo su reactivación también muy rápida (≈ 50 milisegundos) (Litovsky y Antzelevitch, 1988; Fermini y cols., 1992). La amplitud de la I_{to1} es dependiente de la frecuencia cardiaca, por lo que su papel en la DPA es más importante a frecuencias cardiacas lentas.

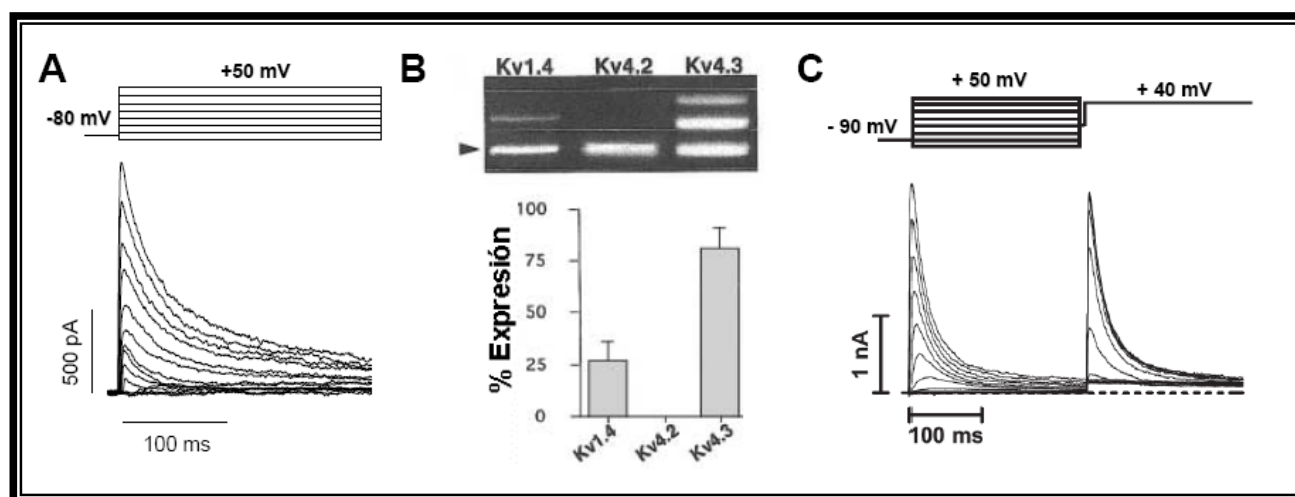


Figura II.20. Características de la I_{to1} . (A) I_{to1} registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Detección por PCR de los distintos tipos de canales que generan la I_{to1} auricular humana (panel superior) y representación de la expresión relativa de su ARNm (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda de control interno. (C) Corriente generada por canales Kv4.3 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptadas de Gómez y cols., 2008 (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Caballero y cols., 2004 (C)]

En el miocardio humano, la densidad de la I_{to1} es ≈ 6 veces mayor en el tejido auricular y en las fibras de Purkinje que en el ventrículo, mientras que, dentro de éste, dicha corriente presenta un gradiente transmural de expresión (epicardio > células M > endocardio, siendo $\approx 3-4$ veces mayor en el epicardio que en el endocardio) (Wettwer y cols., 1994; Näbauer y cols. 1996; Li y cols., 1998).

Actualmente, se distinguen dos fenotipos de I_{to1} : una I_{to1} lenta ($I_{to1,s}$ o *slow*) y una I_{to1} rápida ($I_{to1,f}$ o *fast*). Ambos se diferencian en función de sus propiedades biofísicas, moleculares y farmacológicas (Nerbonne y Kass, 2005; Chiamvimonvat y cols., 2016). Además, existe un patrón

de expresión para ambos fenotipos según la región del miocardio que se estudia: la $I_{to1,s}$ se expresa fundamentalmente en regiones que presentan una DPA más prolongada (endocardio, ventrículo izquierdo, septo y ápex), mientras que la $I_{to1,f}$ se expresa mayoritariamente en regiones epicárdicas, ventrículo derecho y en la base del corazón (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010).

Se ha propuesto que los canales que generan la $I_{to1,s}$ están formados por tetrámeros de subunidades Kv1.4 (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004; Niwa y Nerbonne, 2010) posiblemente asociadas a subunidades Kv β 1 y/o Kv β 2 (Morales y cols., 1995; Serodio y cols., 1996). Por el contrario, los canales que generan en el miocardio humano la $I_{to1,f}$ están formados por subunidades Kv4.3 (**Figura II.20B**) (Dixon y cols., 1996; Kong y cols., 1998; Dilks y cols., 1999). En este caso diversas subunidades auxiliares parecen formar parte del canalosoma que genera la $I_{to1,f}$ incluyendo las subunidades KChIP2 (Bähring y cols., 2001; Kuo y cols., 2001; Rosati y cols., 2001), MiRP1 y MiRP2 (Zhang y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002; Lundby y Olesen, 2006; Radicke y cols., 2006; Delpón y cols., 2008) y DPP6 (Radicke S y cols., 2008).

II. La I_{Kur}

Las células auriculares humanas, pero no las ventriculares (**Figura II.21A**) (Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996a), presentan una corriente ultrarrápida de salida de K^+ con rectificación tardía (I_{Kur}) la cual se activa en el rango de potenciales de la fase de meseta del PA (Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Amos y cols., 1996; Feng y cols., 1998a). Su exclusiva presencia auricular contribuye a que la DPA en este tejido sea más breve que en el ventricular (Feng y cols., 1998b; Tamargo y cols., 2009) y la convierte en una posible diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de arritmias auriculares (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002; Tamargo y cols., 2009).

La I_{Kur} se activa rápidamente (<10 milisegundos) y su inactivación, dada la lentitud del proceso, se considera mínima en condiciones fisiológicas (**Figura II.21**) (Apkon y Nerbonne, 1991; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996a; Tamargo y cols., 2004; Caballero y cols., 2010b). Sin embargo, la recuperación de la inactivación también es muy lenta, lo que tiene gran importancia para explicar la dependencia de frecuencia de esta corriente a potenciales de membrana fisiológicos (Feng y cols., 1998a y 1998b).

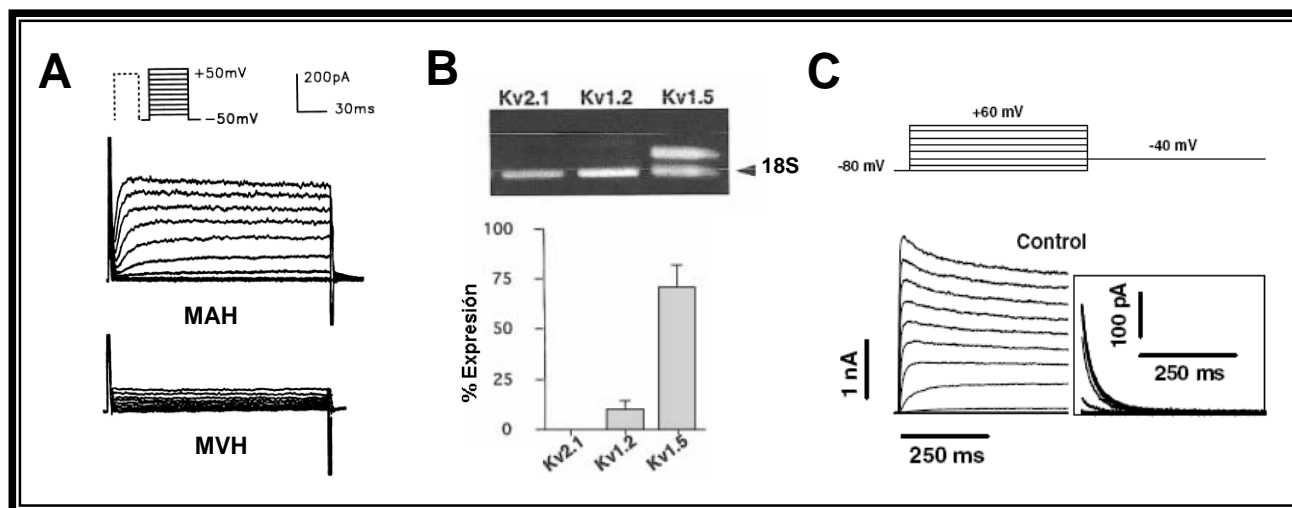


Figura II.21. Características de la I_{Kur} . (A) I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos (MAH) tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Tras aplicar el mismo protocolo en miocitos ventriculares humanos (MVH), la I_{Kur} no aparece. (B) Detección por PCR de canales Kv que generan corrientes tipo I_{Kur} en muestras auriculares humanas (panel superior) y representación de la expresión relativa del ARNm de cada uno (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda del control interno. (C) Corriente generada por canales Kv1.5 humanos expresados en células *Ltk* tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. [Adaptadas de Li y cols., 1996a (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Gómez y cols., 2005 (C)]

La I_{Kur} humana es generada por tetrámeros de subunidades Kv1.5 asociados a subunidades Kv β 1 y Kv β 2 (McCormack y cols., 1999; Nattel y cols., 1999). Cuando se coexpresan con Kv1.5, las subunidades Kv β 1 participan en la regulación del canal proporcionando sitios de interacción para quinasas (PKA, PKC) (Kwak y cols., 1999) y modificando la inhibición producida por diferentes fármacos como la quinidina o la bupivacaína (González y cols., 2002). Por su parte, la asociación de la subunidad Kv β 2.1 con canales Kv1.5 disminuye la expresión de éstos en la membrana, aumenta el grado de la inactivación lenta y desplaza el punto medio de la curva de activación hacia potenciales más negativos (Uebele y cols., 1996; Accili y cols., 1997).

Curiosamente, la proteína Kv1.5 se expresa en igual proporción en aurícula y en ventrículo humano, aunque sólo genera canales funcionales en la aurícula (Fedida y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996a).

III. La I_{Kr}

El componente rápido de la corriente de salida de K^+ con rectificación tardía (I_{Kr}) determina la repolarización durante la fase 3 y juega un papel crítico en el control de la DPA y del periodo refractario cardiacos (Hancox y cols., 1998; Zhou y cols., 1998a; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004; Sanguinetti, 2010).

La I_{Kr} fue identificada originalmente en miocitos ventriculares de cobaya (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990). Estudios posteriores describieron la presencia de la I_{Kr} en fibras de Purkinje y en miocitos auriculares, ventriculares, y del nodo SA de otras especies (Nerbonne, 2000; Tseng, 2001; Schram y cols., 2002) incluyendo la humana (Wang y cols., 1994; Li y cols., 1996b).

III.a. Composición de los canales que generan la I_{Kr}

La subunidad α Kv11.1 (también denominada hERG, *human ether-à-go-go related gene*) es la responsable de generar la I_{Kr} en el miocardio humano (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991; Trudeau y cols., 1995). Estas subunidades, codificadas por el gen *KCNH2*, se ensamblan formando canales homotetraméricos en la membrana de cardiomiocitos (Abbott y cols., 1999). Además de en el miocardio, las subunidades Kv11.1 también son expresadas en otros tejidos como en sistema nervioso, músculo liso e incluso células de origen tumoral (Curran y cols., 1995; Arcangeli y cols., 1997; Cherubini y cols., 2000; Tseng, 2001; Morais-Cabral y Robertson, 2015).

Diversos estudios han sugerido que las subunidades Kv11.1 se asocian con subunidades auxiliares β MiRP1 (*minK-related peptide 1*), codificadas por el gen *KCNE2*, para generar una corriente con las características propias de la I_{Kr} nativa (Abbott y cols., 1999; Sanguinetti, 2010).

- *Subunidad α*

Dentro de la familia de canales Kv existe un pequeño grupo, denominado *ether-a-go-go* o "*eag*", que comprende las subfamilias Kv10 (*eag*), Kv11 (*erg* o "*eag-related gene*") y Kv12 (*elk* o "*eag-like*") (**Figura II.22**) (Ganetzky y cols., 1999; Vandenberg y cols., 2012; Morais-Cabral y Robertson, 2015). Esta clasificación ha sido realizada atendiendo al grado de similitud entre las diferentes secuencias de aminoácidos que componen los canales (Warmke y Ganetzky, 1994). Asimismo, se otorgó el nombre "*eag*" debido a la homología que éstos presentan con los canales EAG, identificados originalmente en moscas del género *Drosophila*, e implicados en la excitabilidad neuronal y en el desarrollo de la capa externa glial de los nervios periféricos durante el estadio larvario (Warmke y cols., 1991; Warmke y Ganetzky, 1994; Yager y cols., 2001).

La subunidad hERG forma parte de la subfamilia de canales Kv11, cuyos miembros (ERG1, ERG2 y ERG3) son ortólogos de la proteína SEI (proveniente del inglés, *seizure*) identificada previamente en *Drosophila* (Titus y cols., 1997; Wang y cols., 1997). En concreto, la subunidad hERG corresponde a la isoforma humana de la proteína ERG1 (**Figura II.22**).

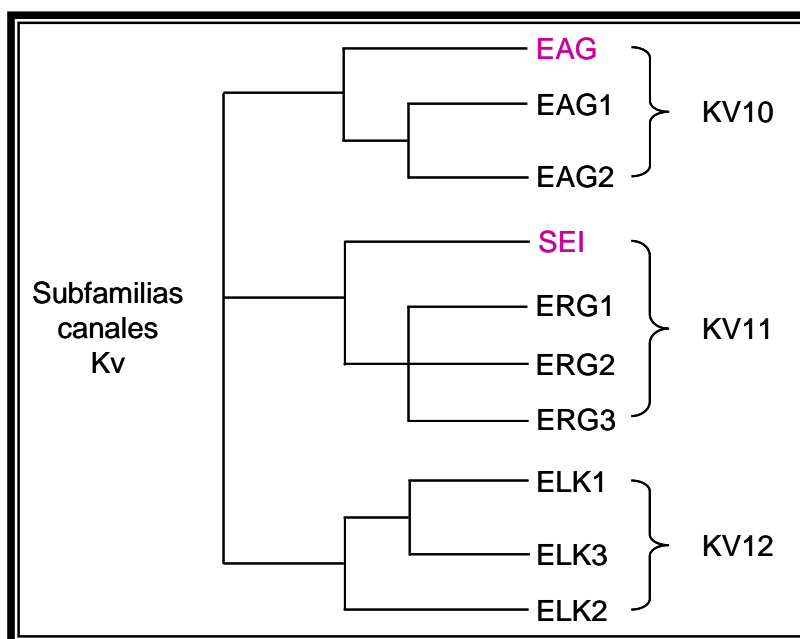


Figura II.22. Clasificación de los canales que forman las subfamilias Kv10-12. En total, 8 tipos de canales se distribuyen en tres subfamilias en función de la similitud de las secuencias de aminoácidos de cada uno de ellos. En magenta se detallan los canales descritos en *Drosophila* sp. La subunidad hERG corresponde a la isoforma humana de la proteína ERG1. La nomenclatura está basada en la establecida por la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR, *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*). [Adaptada de Morais-Cabral y Robertson, 2015]

Al igual que la mayoría de canales Kv, cada subunidad hERG posee una estructura basada en 6 segmentos α -hélice TM (S1-S6) divididos, a su vez, en dos regiones principales: el sensor de voltaje, formado por los segmentos S1 a S4, y el poro iónico, formado por los segmentos S5-S6 y el lazo P que los une y en el que se localiza el filtro de selectividad (Roden y George, 1997; Guy y Durell, 1995; Kukuljan y cols., 1995). En el caso de hERG, dicho lazo P contiene una versión ligeramente modificada de la secuencia que determina la selectividad al K^+ también denominada la “firma de los canales de K^+ ” compuesta por los aminoácidos GYG. En los canales hERG el filtro de selectividad está formado por la secuencia GFG (**Figura II.23**) (Heginbotham y cols., 1994; Doyle y cols., 1998; Tseng, 2001). Como explicaremos más adelante, este cambio de aminoácido está relacionado con el mecanismo de inactivación característico de estos canales.

	<u>Secuencia de selectividad del K⁺</u>	652	656
hERG	AL Y FTFSSLTSV GFG NVSPNTNSEKIFSICVMLIGSLM Y ASI F GNVSAIIQRLY	↓	↓
KcsA	AL WW SVETATTV GYG DLYPVTLLWGRLVAVVVMVAGITSFGLVTAALATWFGRE		
Shaker	AF WW AVVTMTTV GYG DMTPVGFWGKIVGSLCVIAGVLTIAL P VPVIVSNFNIFY		
Kv1	AF WW AVVSMTTV GYG DMYPVTIGGKIVGSLCAIAGVLTIAL P VPVIVSNFNIFY		
Kv2	SF WW ATITMTTV GYG DIYPKTLGKIVGGLCCIAGVLVIAL P IPPIVNNFSEFY		
Kv3	GF WW AVVTMTTL GYG DMYPQTWSGMLVGALCALAGVLTIAM P VPVIVNNFGMY		
Kv4	SF WY TIIVTMTTL GYG DMVPKTIAGKIFGSICSLSGVLVIAL P VPVIVTNFSRIY		
KvLQT1	AL WW GVVTVTTL GYG DKVPQTVWGKTIASCFSVFAISFFAL P AGILGSGFALKV		
	lazo P	hélice S6	

Figura II.23. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes al lazo P y a la α -hélice que forma el segmento S6 de algunos canales de la familia Kv. Los residuos resaltados en negrita y cursiva están involucrados en diferentes propiedades de los canales como el proceso de inactivación tipo-C (residuos del lazo P), así como en la unión de diferentes fármacos a los canales hERG (tirosina (Y) y fenilalanina (F) en el S6). En este último caso los aminoácidos van marcados además con el número que indica su posición dentro de la secuencia. [Adaptada de Tseng, 2001]

Las subunidades hERG (como todos los canales de las subfamilias Kv10, Kv11 y Kv12) poseen dos secuencias en sus dominios N- y C-terminales que les confieren propiedades únicas dentro de la familia de canales de K⁺ dependientes de voltaje (**Figura II.24**) (Tseng, 2001; Morais-Cabral y Robertson, 2015; Coddington y Trudeau, 2019). Por un lado, presentan en el extremo N-terminal un dominio hélice-bucle-hélice “Per-Arnt-Sim”, denominado motivo PAS (o dominio eag), correspondiente a los primeros 135 aminoácidos (Morais Cabral y cols., 1998). Concretamente, los residuos 26 a 135 formarían el dominio PAS, propiamente dicho, mientras que los aminoácidos 1 a 25 formarían la región “caperuza” (en inglés, *cap*), encargada de proteger (Gustina y Trudeau, 2012) y orientar correctamente el inicio del extremo N-terminal favoreciendo la interacción de éste con otras regiones del canal tales como el lazo de unión (región *linker*) entre los segmentos S4 y S5 (De la Peña y cols., 2011; Fernández-Trillo y cols., 2011; Ng y cols., 2011). Diversos estudios han demostrado que el dominio PAS juega un papel crucial en el proceso de deactivación de los canales hERG (Tseng, 2001; Barros y cols., 2012; Gustina y Trudeau, 2012; Morais-Cabral y Robertson, 2015).

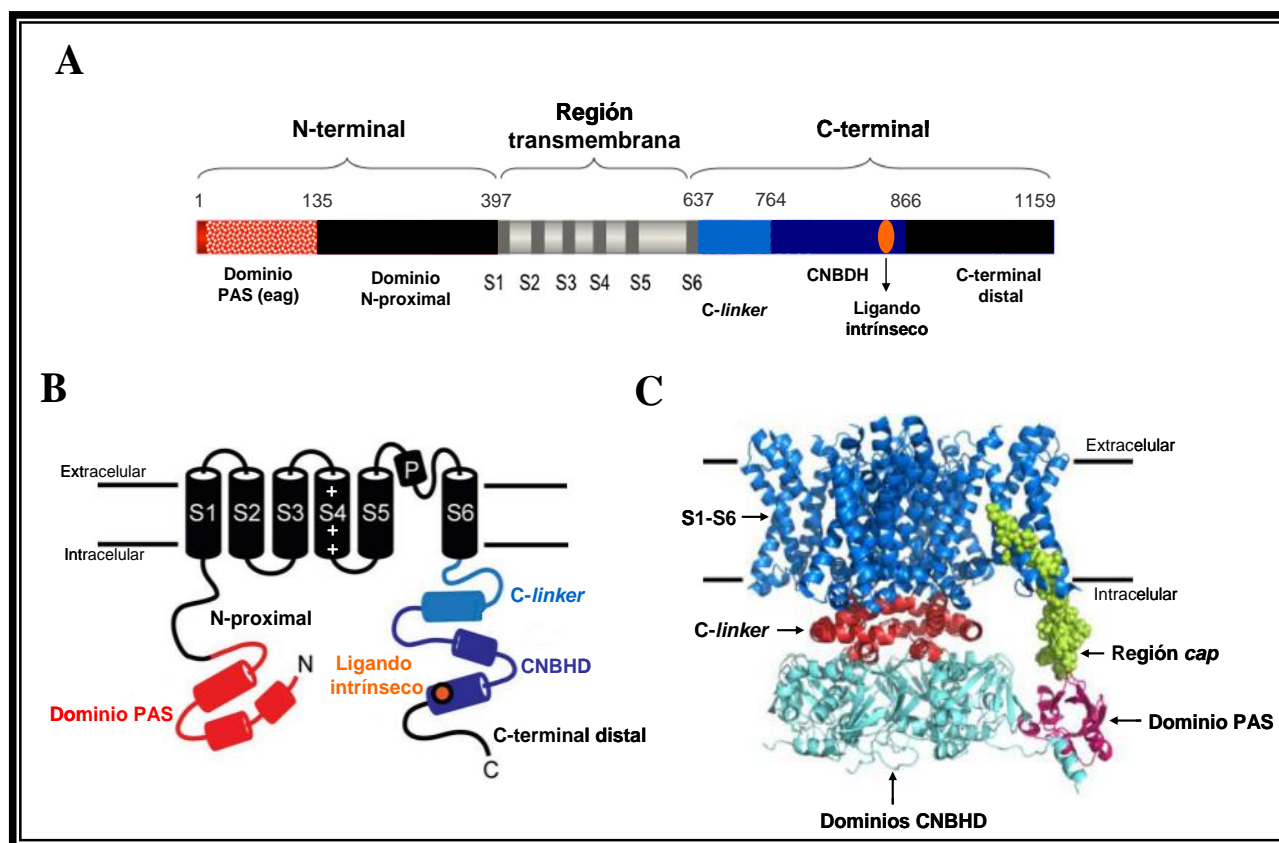


Figura II.24. Estructura de los canales hERG. Esquema lineal (A) y de la estructura terciaria (B) de una de las subunidades α Kv11.1 y estructura cuaternaria (C) de las cuatro subunidades que forman el canal, incluyendo el dominio PAS en el extremo N-terminal, los 6 segmentos transmembrana (S1 a S6) y el dominio homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBDH) en el extremo C-terminal. En (C) se representa en magenta un solo dominio PAS (de cuatro) y en verde la estructura extendida de la región *cap*, la cual es capaz de promover una interacción del extremo N-terminal con otras regiones del canal implicadas en la formación del dominio del poro. [Adaptadas de Barros y cols., 2012 (A), Coddington y Trudeau, 2019 (B) y Morais-Cabral y Robertson, 2015 (C)]

Por otro lado, las subunidades hERG poseen en el extremo C-terminal un dominio CNBDH (*cyclic nucleotide-binding homology domain*) que es homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos presente en los canales CNG (*cyclic nucleotide-gated*) y HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-regulated*) (Warmke y Ganetzky, 1994; Morais Cabral y cols., 1998). En estos dos canales, los aminoácidos que constituyen dicho dominio forman una estructura secundaria en láminas- β , cuya orientación permite la generación de un “bolsillo” o cavidad, cargada positivamente, en cuyo interior se unen los correspondientes nucleótidos cíclicos (con carga negativa) encargados principalmente de regular el proceso de activación (Zagotta y cols., 2003). Las subunidades hERG, sin embargo, no son reguladas por la unión de nucleótidos cíclicos ya que, en este caso, las 9 láminas- β que constituyen dicha cavidad van a estar formadas principalmente por aminoácidos cargados negativamente, lo que genera un fenómeno de repulsión al aproximarse moléculas con la misma carga (Brelidze y cols., 2013).

A pesar de ello, el dominio CNBHD de las subunidades hERG posee una característica muy peculiar, y es que una de las láminas- β que forma la cavidad (concretamente la $\beta 9$) es capaz de orientarse de tal manera que, a través de una secuencia principal de tres aminoácidos, fenilalanina, asparragina y leucina (FNL), puede unirse a una región de la propia cavidad análoga a la que sería el dominio de unión de nucleótidos cíclicos de los canales CNG o HCN (Brelidze y cols., 2012 y 2013; Morais-Cabral y Robertson, 2015; James y Zagotta, 2017). Dicha secuencia ha sido denominada el “ligando intrínseco” y corresponde a los aminoácidos en posiciones 860 a 862 de la subunidad hERG (**Figura II.24**) (Brelidze y cols., 2013; Coddling y Trudeau, 2019).

Aunque la función del “ligando intrínseco” en la interacción con el dominio CNBHD no está del todo clara, una de las consecuencias directas que sí se produce es el bloqueo para la entrada hacia la cavidad de otras moléculas como los nucleótidos cíclicos. Además, varios estudios han demostrado que diversas mutaciones en la secuencia FNL están relacionadas con alteraciones en el *gating* de los canales hERG, tales como una aceleración de la cinética de deactivación o un desplazamiento en la dependencia de voltaje de la activación (Brelidze y cols., 2013; Dai y Zagotta, 2017; Coddling y Trudeau, 2019). Puesto que, como hemos mencionado, el dominio PAS del extremo N-terminal de las subunidades hERG juega un papel importante en el proceso de deactivación, se ha planteado que el “ligando intrínseco” no solo participe en la unión al dominio CNBHD sino que también podría estar mediando una unión entre este dominio de una subunidad hERG con el dominio PAS de otra de las subunidades que se encuentren formando el canal. De hecho, varios autores han confirmado que el dominio PAS, además de interaccionar con la región *linker* que une los segmentos S4 y S5 de las subunidades hERG a través de residuos localizados en las posiciones 91 a 94 (Li y cols., 2010), es capaz de unirse a la región CNBHD de la misma o de distintas subunidades (uniones intra- o interdomino, respectivamente), en este caso a través de los residuos tirosina y arginina localizados en posiciones 43 y 56 (Y43 y R56), respectivamente (**Figura II.25**). En todos los casos, los complejos formados se encuentran directamente implicados en la regulación del *gating* de los canales, y más concretamente, en un control directo sobre la velocidad de deactivación (Gustina y Trudeau, 2011 y 2012; Muskett y cols., 2011; Brelidze y cols., 2013; Gianulis y cols., 2013; Li y cols., 2014; Coddling y Trudeau, 2019).

Cabe destacar que, actualmente, no se ha determinado con exactitud si el propio “ligando intrínseco” es el que favorece la interacción entre los dominios CNBHD y PAS de las subunidades hERG, ya que algunos estudios sugieren que el responsable no es éste sino varios residuos localizados inmediatamente antes, como es el aspartato en posición 803 (D803), del cual se ha sugerido que juega un papel muy importante en dicha interacción (**Figura II.25**) (Haitin y cols., 2013; Li y cols., 2014).

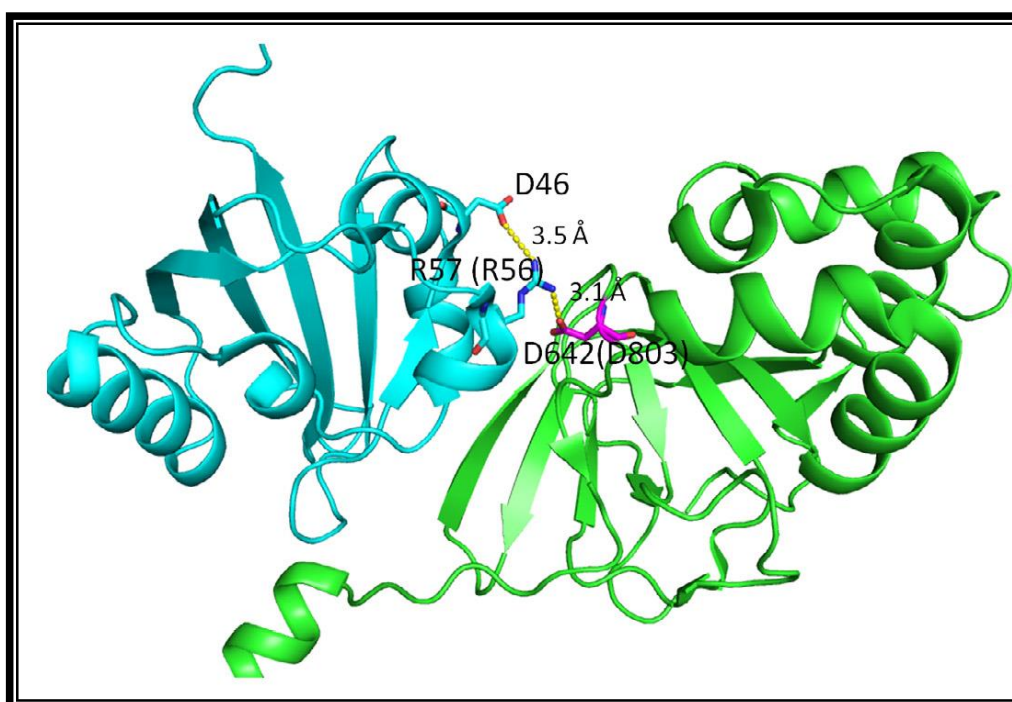


Figura II.25. Estructura del complejo formado entre el dominio PAS del extremo N-terminal (azul) con el dominio CNBHD del extremo C-terminal (verde) en los canales mEAG (canal de la subfamilia Kv10 de ratón, homólogo a los canales hERG de humano). En la figura se muestran los aminoácidos implicados en la formación del complejo. Concretamente, el aminoácido R57 (R56 en canales hERG) del dominio PAS interacciona con el aminoácido D642 (D803 en canales hERG) del dominio CNBHD a través de la formación de puentes salinos. Ambos residuos se encuentran localizados entre sí a una distancia de 3.1 Å. Asimismo, el aminoácido R57 puede unirse a otros aminoácidos de la misma estructura, como el aspartato en posición 46 (D46), estabilizando con ello el complejo formado entre ambos dominios. [Adaptada de Li y cols., 2014]

La subunidad Kv11.1 presenta, al menos, dos isoformas debidas a modificaciones postranscripcionales en su extremo N-terminal, hERG1a y hERG1b (London y cols., 1997; Lees-Miller y cols., 1997). Mientras en la isoforma hERG1a la secuencia de dicho extremo está completa y consta de 396 aminoácidos, en la isoforma hERG1b faltan 36 aminoácidos que afectan a la secuencia de los dominios PAS y *cap* (**Figura II.26**). Debido a ello, la cinética de deactivación de los canales formados por la isoforma hERG1b es unas diez veces más rápida que la correspondiente a la isoforma hERG1a (London y cols., 1997; Wang y cols., 1998; Morais Cabral y cols., 1998; Wang y cols., 2000).

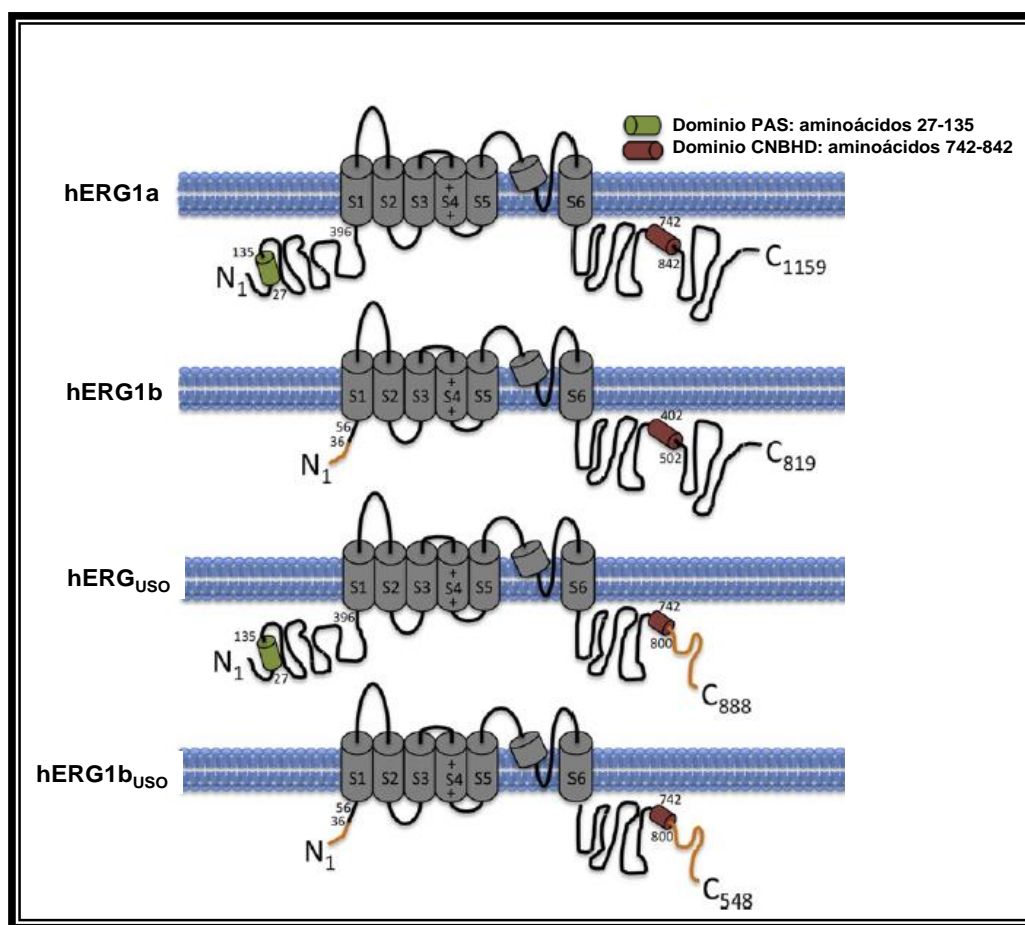


Figura II.26. Estructura de las diferentes isoformas de las subunidades hERG. Mientras que hERG1a está formada por la secuencia completa (1159 aminoácidos), la isoforma hERG1b pierde una región del extremo N-terminal haciendo que la secuencia de la proteína sea mucho más corta (819 aminoácidos). La isoforma hERG_{USO} proviene de una modificación transcripcional mediante *splicing* alternativo a partir del mismo ARNm que la isoforma hERG1a, que resulta en la pérdida de un fragmento del extremo C-terminal. Por su lado, hERG1b_{USO} es la isoforma resultante de la combinación entre hERG_{USO} y hERG1b. [Adaptada de Jonsson y cols., 2012]

Las subunidades hERG1a y hERG1b pueden unirse entre sí formando complejos homo- o heterotetraméricos, de tal manera que la cinética de deactivación de los canales resultantes dependerá de la proporción en los niveles de expresión de cada isoforma (London y cols., 1997). Los complejos heterotetraméricos son los que mejor recapitulan las propiedades del *gating* de los canales que generan la I_{Kr} nativa en el miocardio humano (Jones y cols., 2004). De hecho, Sale y colaboradores observaron un aumento en la I_{Kr} generada por complejos heterotetraméricos con respecto a aquella generada por complejos formados únicamente por la isoforma hERG1a, confirmando que la presencia de la isoforma hERG1b propiciaba que los canales permaneciesen durante más tiempo en un estado conformacional abierto (Sales y cols., 2008).

Además de estas dos isoformas, existe una tercera variante que fue identificada en el miocardio humano a partir de una modificación transcripcional por un mecanismo de *splicing* alternativo en el mismo ARNm que codifica hERG1a (Kupersmidt y cols., 1998). Dicha isoforma,

denominada como hERG_{USO}, es estructuralmente muy similar a hERG1a, a excepción de la pérdida de un fragmento de la secuencia del extremo C-terminal (**Figura II.26**). Al contrario que hERG1a y hERG1b, la subunidad hERG_{USO} no es capaz de formar canales funcionales por sí sola (Tseng, 2001; Jonsson y cols., 2012), a pesar de que los niveles de ARNm de dicha variante son dos veces más abundantes en relación a las otras dos isoformas. Varios estudios han confirmado que la cotransfección de hERG1a con la isoforma hERG_{USO}, genera canales con un retraso en la cinética de activación y un desplazamiento en la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales más negativos (Tseng, 2001; Jonsson y cols., 2012).

Por último, Guasti y colaboradores describieron la existencia en células tumorales de una cuarta isoforma, hERG1b_{USO}, resultado de una combinación entre las isoformas hERG1b y hERG_{USO} (Guasti y cols., 2008). Sin embargo, aún se requieren estudios más detallados con el fin de identificar con exactitud la estructura y función de esta isoforma en el miocardio.

- *Subunidad β*

La I_{Kr} nativa y la corriente generada por los canales Kv11.1 expresados en sistemas heterólogos ($I_{Kv11.1}$) presentan varias diferencias respecto al *gating* y la conductancia de los canales, así como la regulación de éstos por factores extrínsecos como la $[K^+]_e$. Así pues, diversos estudios sugieren que diferentes subunidades auxiliares podrían estar implicadas en la generación de dicha corriente nativa (Tseng, 2001; Tristani-Firouzi y Sanguinetti, 2003). La primera evidencia de que podrían existir subunidades β reguladoras que modulasen la función de las subunidades hERG apareció a raíz de un estudio realizado en una línea tumoral de miocitos auriculares de origen murino (AT-1) en los que la proteína auxiliar minK fue silenciada mediante la utilización de oligonucleótidos específicos antisentido. Al silenciar la expresión de minK, se observó una disminución en la amplitud de la I_{Kr} lo que sugirió entonces la posible interacción entre ambas subunidades (Yang y cols., 1995). De hecho, estudios posteriores en células CHO demostraron que las subunidades hERG y minK eran capaces de formar complejos estables a nivel de membrana (McDonald y cols., 1997). Asimismo, Kupershmidt y colaboradores realizaron un estudio empleando ratones *knock-out* homocigotos para minK ($kcne1^{-/-}$) y demostraron que la I_{Kr} generada fue significativamente menor, y con una cinética de deactivación más lenta (Kupershmidt y cols., 1998). Sin embargo, todavía existen respecto a si minK interacciona con los canales hERG en el miocardio ventricular humano.

En 1999 se identificaron cuatro familias de genes que codificaban péptidos relacionados con minK (MiRPs o *MinK Related Peptides*) (Abbott y cols., 1999; McCrossan y Abbott, 2004). Son los genes denominados *KCNE1-4*. *KCNE1* codifica minK mientras que *KCNE2* a *KCNE5* codifican las subunidades MiRP1 a MiRP4 respectivamente. Todas las subunidades constan de un único segmento TM, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

Se ha demostrado que, *in vitro*, las subunidades MiRP1 y hERG son capaces de formar complejos estables (Abbott y cols., 1999; Cui y cols., 2000). MiRP1 es capaz de modificar el *gating* de los canales, acelerando la cinética de desactivación, desplazando la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales positivos, y reduciendo o aumentando la sensibilidad de los canales al aumento de la $[K^+]_e$ y a ciertos fármacos inhibidores de la I_{Kr} como el E-4031 o la claritromicina, respectivamente (Abbott y cols., 1999).

La subunidad auxiliar MiRP1 se expresa preferentemente en fibras de Purkinje y células del nodo SA mientras que a nivel auricular y ventricular su expresión es muy baja (Lundquist y cols., 2005), sugiriendo que dicha subunidad sólo interacciona con hERG en el sistema especializado de conducción (Weerapura y cols., 2002). Sin embargo, la importancia de MiRP1 en la generación de la I_{Kr} sí que ha sido confirmada en el tejido miocárdico al identificar diversas mutaciones asociadas con la aparición de Síndrome QT Largo (SQTL) congénito tipo 6 (SQTL6) o adquirido (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Sesti y cols., 2000).

Los datos obtenidos hasta la fecha sugieren, pues, que MiRP1 se corresponde con la subunidad auxiliar β de canales que generan la I_{Kr} nativa en miocitos cardiacos, a pesar de que actualmente no existe evidencia alguna que demuestre una asociación directa entre ambas subunidades.

III.b. Características de la I_{Kr}

En condiciones fisiológicas normales, la despolarización del E_m (fase 0 del PA) produce un desplazamiento en el equilibrio conformacional de los canales Kv (incluyendo los canales hERG) desde un estado cerrado no conductor ("C") hacia el estado abierto ("O"), lo que permite el flujo de K^+ hacia el exterior de la célula impulsado por el gradiente electroquímico del ión. Si la despolarización se mantiene, se produce un desplazamiento a un estado conformacional no conductor, denominado estado inactivo ("I"). La repolarización de la membrana revierte esta secuencia de eventos, desplazando el estado conformacional de la proteína de nuevo a través del estado abierto hacia el estado cerrado. Sin embargo, los canales hERG presentan una peculiaridad

única respecto al resto de canales de K^+ , y es que van a transportar más K^+ durante la repolarización que durante la despolarización del E_m debido a que, mientras que la cinética de la transición C-O es lenta, la transición del paso O-I es extremadamente rápida (**Figura II.27A**). Así, con la despolarización se va a producir un aumento progresivo en la amplitud de la I_{Kr} , hasta alcanzar un máximo a potenciales de entre 0 y +10 mV. A potenciales más positivos, la corriente disminuye, es decir, los canales hERG presentan “rectificación interna”, lo que significa que la conductancia no aumenta de forma lineal con la despolarización del E_m . En el caso de los canales hERG la rectificación interna es debida a que a potenciales más despolarizados de 0 ó +10 mV la cinética de inactivación del canal es más rápida que la activación, de hecho la precede (**Figura II.27B**) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Li y cols., 1996b; Spector y cols., 1996; Smith y cols., 1996; Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001). No obstante, con la repolarización (fase 3 del PA), la rapidísima transición I-O (recuperación de la inactivación) seguida de una lenta deactivación (transición de O-C) mantendrá los canales en su conformación abierta durante un tiempo suficiente para generar una corriente de gran amplitud que facilitará la repolarización final del PA (**Figura II.27B**) (Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001).

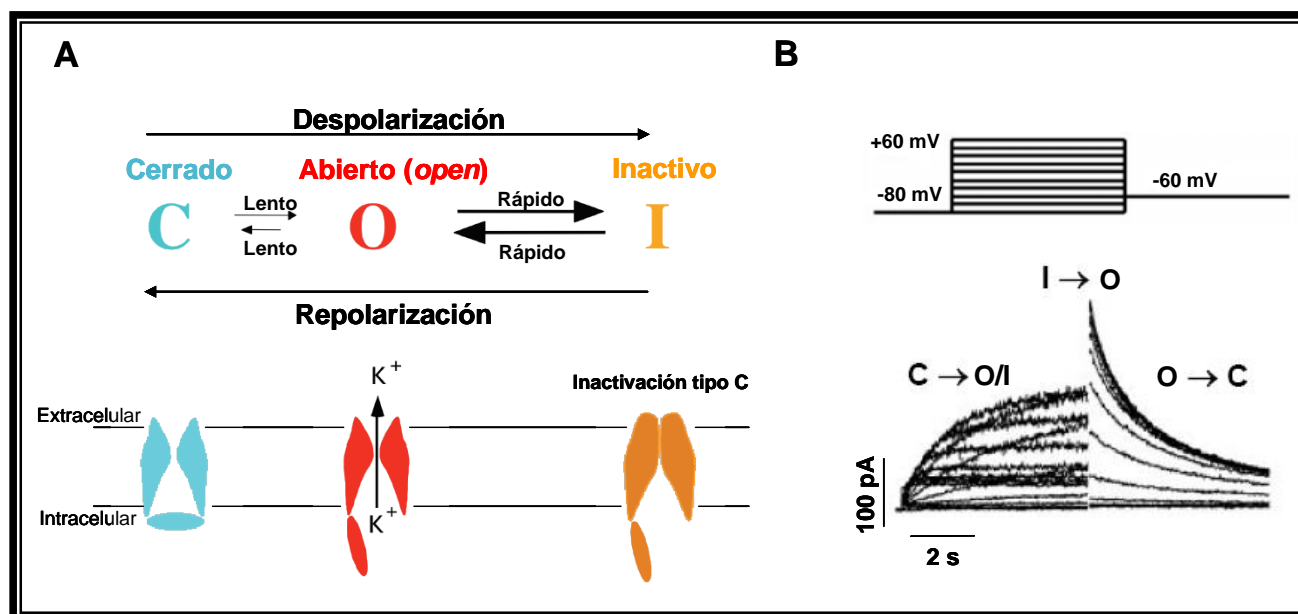


Figura II.27. (A) Representación esquemática de los distintos estados conformacionales del canal hERG. (B) Registro de la I_{hERG} generada tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior en células CHO transfectadas con subunidades Kv11.1. Se muestran las transiciones entre las diferentes conformaciones del canal (O: Abierto. C: Cerrado. I: Inactivo). [Adaptadas de Barros y cols., 2012 (A) y Caballero y cols., 2003 (B)]

Esta peculiaridad funcional de los canales hERG es crítica para determinar su papel fisiológico tanto en las células miocárdicas como en otros tipos celulares donde dichos canales también se expresan (Arcangeli y cols., 1997; Cherubini y cols., 2000; Tseng, 2001; Morais-Cabral

y Robertson, 2015). Asimismo, la rectificación interna de los canales hERG permite la existencia de una larga fase de meseta (fase 2 del PA) característica de los PAs cardíacos, lo que a su vez favorece el flujo hacia el interior del Ca^{2+} necesario para la contracción cardíaca.

Una consecuencia adicional de este comportamiento de los canales hERG es que, debido a su lenta desactivación durante la repolarización, éstos aún permanecerán abiertos decenas de milisegundos tras la finalización de dicha fase, a pesar de que la corriente generada en este período (corriente sostenida (Lu y cols., 2001)) es mínima ya que a un potencial de reposo de la célula cercano a -80 mV el gradiente electroquímico del K^+ es mínimo. Así pues, si antes de finalizar esta etapa se generase una nueva despolarización (PA prematuro), estos canales podrán ser activados de manera más rápida que si estuviesen en un estado cerrado no conductor. El resultado es que el número total de canales hERG activos durante este segundo PA, y por tanto la corriente generada por ellos, será de igual magnitud o incluso mayor que durante el primer PA. Gracias a ello, el gradiente electroquímico de K^+ generado ejercerá un doble efecto: por una parte, suprimirá la activación de los canales de Na^+ que en ese momento se encontraban en periodo refractario relativo preparados para volver a abrirse ante el segundo estímulo prematuro, y por otra parte, impedirá la reactivación de los canales de Ca^{2+} tipo-L, ya que el periodo ventana de éstos coincidirá con el máximo de corriente de K^+ . El periodo ventana de los canales de Ca^{2+} tipo-L se define como el rango de potenciales de membrana (comprendido entre -15 y -40 mV) en el que la $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ que ha sido inactivada en gran parte durante la fase de meseta del PA puede ser parcialmente reactivada según la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuye. Este periodo tiene lugar cuando el PA cardíaco se prolonga de forma excesiva (prolongación del intervalo QT) y la consiguiente reactivación de los canales puede causar una despolarización neta del potencial de membrana e inducir pospotenciales tempranos y actividad desencadenada (*triggered focal activity*) (Hirano y cols., 1992). En definitiva, la activación de los canales hERG contribuirá a suprimir la propagación del extrasístole prematuro y, por consiguiente, la aparición de arritmias por mecanismos de reentrada (Lu y cols., 2001).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que mutaciones en los canales hERG, concretamente en el lazo P y en la mitad del extremo N-terminal del S6, modifican el proceso de inactivación rápida (Hoshi y cols., 1991; Schonherr y Heinemann, 1996; Smith y cols., 1996; Herzberg y cols., 1998; Zou y cols., 1998; Fan y cols., 1999). Estas regiones son equivalentes a aquellas que regulan el proceso de inactivación tipo-C de los canales *Shaker* (Hoshi y cols., 1991) por lo que se ha sugerido que ambos procesos se desarrollan a partir de un mecanismo similar. En los canales *Shaker*, la inactivación tipo-C resulta de un movimiento concertado de las cuatro subunidades que forman el canal (Panyi y cols., 1995; Ogielska y cols., 1995), lo que causa un cambio conformacional en la boca del poro (Yellen y cols., 1994) que por un lado lo constriñe

impidiendo el flujo de iones a través de él y, por otro lado, modifica la selectividad iónica de tal manera que el canal no pueda conducir iones K^+ (Starkus y cols., 1997). Actualmente, sin embargo, se ha propuesto que la inactivación tipo-C puede ocurrir en ausencia de dicho estrechamiento (Devaraneni y cols., 2013) y, en lugar de ello, podría ser consecuencia de una dilatación del poro justo en la zona más externa del mismo en la zona de unión a los iones K^+ en el filtro de selectividad del canal (Hoshi y Armstrong, 2013).

A pesar de la similitud entre los elementos estructurales involucrados en la inactivación tipo-C de los canales *Shaker* y hERG, existen claras diferencias entre ellos que merecen especial atención y es que, al contrario que en los canales *Shaker*, la inactivación de los canales hERG es dependiente de voltaje y presenta una cinética aproximadamente 100 veces más rápida (Spector y cols., 1996; Wu y cols., 2014). Diversos estudios han sugerido que esta diferencia es consecuencia de dos características de los canales hERG. Por un lado, la dependencia de voltaje podría ser debida al movimiento producido en ciertos residuos del canal impulsados por la despolarización de la membrana. De hecho, ha sido demostrada la existencia de cambios en la estructura dependientes de voltaje que ocurren en una escala temporal compatible con aquella observada durante el proceso de inactivación (Smith y Yellen, 2002). Mientras que varios autores defienden que dicho movimiento podría ser producido en torno al sensor de voltaje que forman los segmentos S4 de cada una de las subunidades hERG, otros autores afirman que los residuos implicados no corresponden con el propio sensor sino más bien con una serie de aminoácidos cargados localizados en la región extracelular del canal, concretamente en el extremo N-terminal del lazo P (secuencia comprendida entre los residuos 571 a 614) (Vandenberg y cols., 2004; Zhang y cols., 2004; Piper y cols., 2005). Entre ellos, cabría destacar el aspartato (D) y la lisina (K) localizados en las posiciones 591 y 595, respectivamente, ya que se ha sugerido que la presencia de mutaciones en dichos aminoácidos dan como resultado canales que no inactivan (D591C) o, directamente, no son funcionales (K595C) (Liu y cols., 2002).

Por otro lado, ha sido demostrado que la cinética de inactivación tan rápida de los canales hERG se debe fundamentalmente a la estructura de la boca externa del poro, la cual es más estrecha y flexible que la de los canales *Shaker*, permitiendo con ello que el reordenamiento producido por las subunidades durante el proceso de inactivación requiera un movimiento menor y mucho más rápido (Fan y cols., 1999; Dun y cols., 1999; Perrin y cols., 2008). Los determinantes moleculares que explicarían esta diferencia entre las bocas externas de los poros de ambos canales pueden ser identificados al comparar entre sí las secuencias de aminoácidos de los respectivos lazos P (**Figura II.23**). En el caso de los canales *Shaker*, dicha secuencia presenta dos triptófanos (WW) en el extremo N-terminal así como una tirosina (Y) en el filtro de selectividad del K (GYG). De acuerdo

con la estructura cristalizada del canal *KcsA*, se pueden formar puentes de hidrógeno entre los nitrógenos de los triptófanos de una de las subunidades con los grupos hidroxilo de las tirosinas del resto de subunidades que forman el canal. Estos puentes de hidrógeno favorecen un desplazamiento en el equilibrio conformacional de la boca externa del poro hacia un estado activo conductor (Doyle y cols., 1998). Por el contrario, en los canales hERG los triptófanos son reemplazados por tirosina/fenilalanina (YF) y la tirosina del filtro de selectividad es reemplazada por una fenilalanina, dando lugar a la pérdida de puentes de hidrógeno y, con ello, al desarrollo de una estructura más débil y estrecha, aunque mucho más flexible. De hecho, dicha flexibilidad proporciona una segunda característica al lazo P, y es que su extremo carboxilo, el cual se encuentra inmerso en la membrana plasmática de la célula cardiaca, va a tener la posibilidad de deslizarse o girar en respuesta a la despolarización del potencial de membrana, siendo este movimiento en último término responsable, como hemos mencionado en el párrafo anterior, de la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales hERG (Zhang y cols., 2004).

III.c. Regulación de la I_{Kr}

La I_{Kr} puede ser regulada por factores intrínsecos tales como el grado de expresión de las diferentes subunidades que forman los canales hERG así como las propiedades biofísicas que los caracterizan, y por factores extrínsecos como la temperatura, la composición del medio extracelular, cambios en el pH o la estimulación de receptores adrenérgicos en la membrana de los cardiomiocitos.

- *Regulación de la I_{Kr} por factores intrínsecos*

La expresión de los canales hERG es un proceso dinámico cuyos niveles van a ser dependientes de especie, órgano, tejido e incluso del estado de diferenciación y etapa del ciclo celular. Asimismo, en órganos como el corazón, los canales hERG se distribuyen de manera diferente en función de cada uno de los tejidos que lo componen. Así pues, diversos autores han estudiado en detalle los niveles de expresión de los canales ERG en el tejido cardiaco de diferentes especies animales. Mientras en el hurón, por ejemplo, la expresión es más abundante en la región epicárdica ventricular (Brahmajothi y cols., 1997), en el ventrículo izquierdo de conejo existe un gradiente de densidad con un mayor número de canales en la región del ápex y un menor número en la base (Cheng y cols., 1999). Cabe destacar que, en el conejo, la I_{Kr} es generada en las células del nodo SA, donde ejerce un importante papel en el control de la actividad marcapasos (Verheijck y

cols., 1995), así como en células del nodo AV y en las células de Purkinje (Nerbonne, 2000; Schram y cols., 2002; Tamargo y cols., 2004). En los miocitos del ventrículo izquierdo de cobayo y de gato existe un gradiente transmural, de manera que la densidad de la I_{Kr} es significativamente mayor en el epicardio que en el endocardio (Main y cols., 1998; Furukawa y cols., 1992). En el miocardio humano, la expresión de canales hERG, así como la densidad de la I_{Kr} generada, es mayor a nivel ventricular que auricular, mientras que en la rata y el cobayo ocurre lo contrario (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1991; Pond y cols., 2000; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004). Además, en el miocardio humano existe un gradiente de expresión de los canales hERG a nivel interventricular e interauricular, de tal manera que ésta es mayor en el ventrículo y aurícula derechos que en ventrículo y aurícula izquierdos. Acorde a ello, la DPA es más corta en el ventrículo derecho que en el izquierdo, lo que representa un mecanismo relevante en el control de la arritmogénesis bajo condiciones fisiológicas normales (Luo y cols., 2008).

Las diferencias en la expresión de los canales hERG van a venir determinadas fundamentalmente por modificaciones transcripcionales y postranscripcionales en las subunidades que los forman. De hecho, se han identificado varios factores de transcripción tales como GATA1 y 3, Hand2, el factor de respuesta al suero (SRF) y MyoD, que son capaces de unirse a secuencias consenso específicas dentro de la región promotora del gen *KCNH2* y regular la expresión de los canales hERG durante la etapa de cardiogénesis (Luo y cols., 2008). Asimismo, tanto la región promotora de la isoforma hERG1a como la de hERG1b poseen varias secuencias consenso para la unión de la proteína estimulante 1 (*Stimulating protein 1* o Sp1) (Luo y cols., 2008), la cual pertenece a la familia multigénica de factores de transcripción con dedos de zinc capaces de unirse a secuencias de ADN en células de mamífero gracias a la interacción con regiones ricas en dinucleótidos guanina-citosina (GC) (Kadonaga y cols., 1988; Pugh y Tjian, 1990; Kaczynski y cols., 2003). La unión de Sp1 a dichos promotores se encuentra implicada en la determinación del sitio de inicio de la transcripción en los genes a los que regula.

- *Regulación de la I_{Kr} por factores extrínsecos*

Varios factores extrínsecos como la $[K^+]_e$, modificaciones del pH, estimulación β -adrenérgica de los cardiomiocitos o diversas condiciones patológicas, son capaces de regular la densidad de la I_{Kr} generada por los canales hERG en las células cardíacas.

Regulación de la I_{Kr} por cambios en la composición del medio extracelular

La $[K^+]_e$ local es un factor determinante de la densidad de la I_{Kr} así como de la cinética de deactivación de los canales hERG (Scamps y Carmeliet, 1989; Sanguinetti y Jurkiewicz, 1992; Yang y cols., 1997). Paradójicamente, un aumento de la $[K^+]_e$ va a dar lugar a un aumento en la amplitud de la corriente generada, a pesar de observarse una disminución en la fuerza electromotriz para el K^+ (Sanguinetti y cols., 1995; Sanguinetti y Jurkiewicz, 1992). Este aumento en la I_{Kr} es debido a que la acumulación de iones K^+ en el espacio extracelular va a impedir que tengan lugar cambios conformacionales en la boca externa del poro que producen la inactivación y, por tanto, los canales hERG van a permanecer más tiempo en un estado activo conductor (Baukrowitz y Yellen, 1995; Yang y cols., 1997; Wang y cols., 1997). Por otro lado, un aumento en la $[K^+]_e$ va a disminuir la afinidad de los canales hERG por otros iones como el Na^+ (Numaguchi y cols., 2000).

Otro de los factores a tener en cuenta son los cambios producidos en el pH extracelular. La acidificación (hasta un pH de 6.4 o 6) produce aceleración de la cinética de deactivación de los canales hERG (Vereecke y Carmeliet, 2000; Jiang y cols., 1999; Berube y cols., 1999; Anumonwo y cols., 1999), con pocos o ningún cambio en la densidad de la I_{Kr} . Al acidificar el medio se protonan ciertos residuos de la superficie extracelular de los canales hERG, induciendo sucesivos cambios alostéricos que desestabilizan la unión producida entre el dominio N-terminal y el lazo que une los segmentos S4 y S5 en la cara interna del poro a potenciales negativos. Dicho proceso es lo que conlleva, en último término, al desarrollo de una cinética de deactivación de los canales mucho más rápida que la observada bajo condiciones a pH fisiológico (Tseng, 2001).

Regulación de la I_{Kr} por estimulación β -adrenérgica

Los canales hERG presentan cuatro sitios de fosforilación por la protein-quinasa (PKA) dependiente de AMP cíclico (AMPC) así como el mencionado dominio homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBHD) en el extremo C-terminal. Debido a ello, estos canales pueden ser modulados, tras la estimulación de receptores β -adrenérgicos, bien por una vía dependiente de fosforilación mediada por la PKA, o bien por la unión directa del AMPC al dominio CNBHD (**Figura II.28**) (Cui y cols., 2000; Kiehn, 2000; Cui y cols., 2001).

La estimulación de receptores β -adrenérgicos en la membrana de cardiomiocitos conlleva a la activación de la adenilato ciclasa lo que, a su vez, produce un aumento en los niveles de AMPC intracelulares. El AMPC será el encargado de activar a la PKA, la cual fosforila los canales hERG,

produciendo una disminución de la I_{Kr} así como un desplazamiento hacia potenciales positivos en la dependencia de voltaje de la activación y una disminución en las constantes de tiempo de la cinética de deactivación. Diversos estudios han demostrado que los efectos producidos por la PKA sobre los canales hERG pueden revertirse al eliminar los cuatro sitios de fosforilación (S283, S890, T895, S1137) o alternativamente, utilizando inhibidores específicos de dicha protein-quinasa, tales como H89 o KT5720 (Thomas y cols., 1999; Cui y cols., 2000). Asimismo, la coexpresión de los canales hERG junto con las subunidades auxiliares minK o MiRP1 acentúa el desplazamiento en la dependencia de voltaje de la activación inducido por AMPc (Cui y cols., 2000).

Varios autores han sugerido que la interacción dinámica de los canales hERG con la proteína reguladora de pequeño tamaño 14-3-3, podría modificar los efectos producidos por la fosforilación a través de la PKA (**Figura II.28**) (Kagan y cols., 2002; Thomas y cols., 2006; Tutor y cols., 2006).

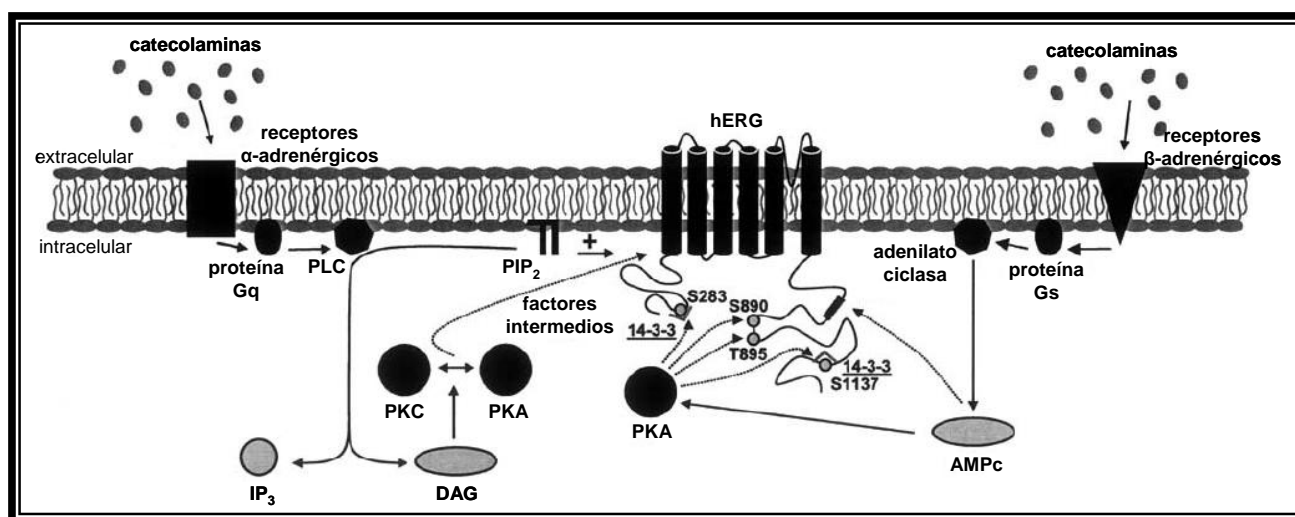


Figura II.28. Modulación de los canales hERG por diferentes vías de estimulación adrenérgica. Por un lado, la estimulación de los receptores α -adrenérgicos activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) de membrana dando lugar a inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). EL DAG activa, a su vez, a la protein-quinasa C (PKC) que, junto con la protein-quinasa A (PKA), modulan los niveles de activación de los canales hERG a través de factores intermedios por una vía independiente de fosforilación. Asimismo, el PIP_2 , por sí solo, puede interaccionar directamente con los canales hERG y producir un aumento en la corriente generada por éstos. Por otro lado, la estimulación de receptores β -adrenérgicos activa la adenilato ciclasa, lo que deriva en un aumento en los niveles de AMPc intracelular con la consiguiente activación de la PKA. Dicha protein-quinasa es capaz de disminuir la corriente generada por los canales hERG a través de la fosforilación directa de éstos en sus cuatro sitios de fosforilación (S283, S890, T895, S1137). Dicho proceso es potenciado además por la acción de la proteína accesoria de pequeño tamaño 14-3-3. Por último, el AMPc, por sí solo, es capaz de aumentar la corriente generada por los canales a través de la unión directa con el dominio CNBHD. [Adaptada de Thomas y cols., 2006]

Por otro lado, los canales hERG también pueden ser modulados por el enzima protein-quinasa C (PKC) por una vía tanto independiente (Barros y cols., 1998; Thomas y cols., 2003) como dependiente de fosforilación. En ambos casos, el origen se encuentra en la estimulación de receptores cardiacos α_1A -/ α_1C -adrenérgicos asociados a proteínas G, los cuales van a activar la enzima fosfolipasa C (PLC) que a su vez dará lugar a un aumento en los niveles del segundo

mensajero diacilglicerol (DAG) a partir de la hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂). El DAG será el encargado en último término de activar a la PKC (**Figura II.28**). Cabe destacar que el PIP₂, por sí solo, es capaz de aumentar la amplitud de la I_{Kr} y desplazar la dependencia de voltaje de la activación de los canales hERG hacia potenciales más negativos (Bian y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004). Este efecto es posible gracias a una interacción electrostática entre los grupos fosfato del PIP₂, cargados negativamente, con los aminoácidos con carga positiva presentes en las diferentes subunidades que forman los canales y que favorece que éstos permanezcan por más tiempo en un estado abierto (Bian y cols., 2001).

Recientemente, Sutherland-Deveen y colaboradores han demostrado que la activación de la PKC mediada por el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), regula los canales hERG de manera diferente en función de si ésta es activada de forma aguda (durante al menos 30 minutos) o prolongada (durante al menos 16 horas) (Sutherland-Deveen y cols., 2019). La activación aguda de la PKC va a dar lugar a la fosforilación de la tirosina en posición 74 (T74) del extremo N-terminal del canal como había sido descrito por otros autores (Cockerill y cols., 2007; Liu y cols., 2017). El resultado es una disminución de la I_{Kr} así como un desplazamiento de la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales positivos. Aun así, actualmente se desconoce si este proceso es llevado a cabo directamente por la PKC o, por el contrario, se encuentra implicada otra quinasa que, a su vez, ha sido fosforilada y activada previamente por ésta. Por otro lado, la activación prolongada de la PKC da lugar a un aumento de la expresión de los canales hERG con el consiguiente aumento en la corriente generada por éstos. En este caso, la PKC no fosforila directamente el canal sino a otras proteínas como Nedd4-2, inhibiendo su actividad. Nedd4-2 es una ubiquitin ligasa E3 encargada de promover la ubiquitinación de diferentes proteínas para su degradación vía proteasoma (Yang y Kumar, 2010). Este mecanismo de degradación es el que precisamente es utilizado por los canales hERG (Guo y cols., 2012). Por tanto, la fosforilación de Nedd4-2 dará lugar a una disminución de la ubiquitinación y de la degradación de los canales, con la consiguiente acumulación de éstos en la membrana plasmática. Es necesario señalar que, además de esta última vía, diversos estudios han propuesto que la activación crónica de la PKC potencia la expresión de los canales hERG no por una disminución en su degradación sino a través de modificaciones postranscripcionales durante el proceso de síntesis (Chen y cols., 2010; Krishnan y cols., 2012).

A pesar de todo, hay que tener en cuenta que la activación de la PKC por el PMA no resulta de un proceso fisiológico, por lo que los mecanismos consecuentes a dicha activación podrían no corresponder con lo que ocurre realmente en el miocardio humano. De hecho, se conoce que el PMA es capaz de activar varias isoformas de la PKC (McFerran y cols., 1995) mientras que la estimulación de los receptores $\alpha 1A$ -/ $\alpha 1C$ -adrenérgicos promueven únicamente la activación de la

isoforma específica, en nuestro caso la cardíaca (Liu y cols., 2017). Sin embargo, se ha demostrado que ambos mecanismos son muy semejantes, ya que, al igual que sucede con el PMA, la estimulación aguda de los receptores α -adrenérgicos inhibe la I_{Kr} generada por los canales hERG y desplaza la dependencia de voltaje de la activación en una vía en la que se también se encuentra implicada la fosforilación del extremo N-terminal de los canales (Thomas y cols., 2004; Cockerill y cols., 2007; Liu y cols., 2017), mientras que la estimulación crónica de los receptores aumenta la expresión de los canales hERG y la corriente generada por ellos (Chen y cols., 2010; Wang y cols., 2014; Mahati y cols., 2016).

Además de la participación de receptores $\alpha 1A/\alpha 1C$ -adrenérgicos, la vía de regulación de los canales hERG mediada por la PKC también puede activarse a partir de la estimulación de receptores asociados a hormonas, como es el caso de la hormona liberadora de tirotropina (TRH). La activación de estos receptores va a enlentecer y acelerar la cinética de activación y deactivación, respectivamente, de los canales hERG, desplazando asimismo la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales positivos (Gomez-Varela y cols., 2003). Diversos estudios han sugerido que, en este caso, la región de los canales implicada en dicho mecanismo va a ser el dominio N-proximal de las subunidades hERG, encargado de unir el dominio PAS del extremo N-terminal con el segmento transmembrana S1 (**Figura II.24 y II.29**) (Barros y cols., 1998; Gomez-Varela y cols., 2003; Alonso-Ron y cols., 2009; Barros y cols., 2012). De hecho, un estudio realizado por Saenen y colaboradores ha demostrado que el dominio N-proximal juega un papel muy importante en la regulación del mecanismo de activación de los canales hERG, gracias a la presencia de un *cluster* compuesto por aminoácidos en su mayoría cargados positivamente y denominado como KIKER (Lisina(K) - Isoleucina(I) - Lisina(K) - Glutámico(E) – Arginina(R)). Estos residuos ocupan las posiciones 362 a 366 de la subunidad hERG (**Figura II.29**) y van a encargarse de regular la activación de los canales a través de interacciones de tipo electrostático con otras regiones del canal tales como el extremo intracelular de los segmentos S4 y S6, o incluso la región de interacción entre los segmentos S4 y S5 (Saenen y cols., 2006).

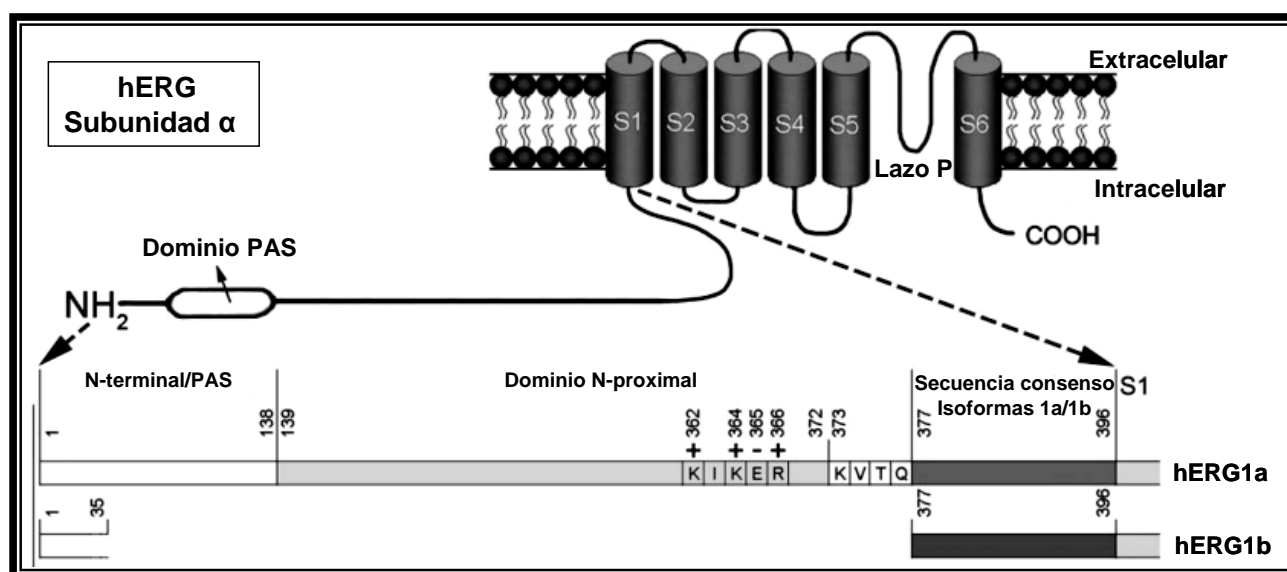


Figura II.29. Representación esquemática del dominio N-terminal de la subunidad hERG. La secuencia en la isoforma hERG1a se divide, a su vez, en tres regiones principales: el extremo N-terminal formado por el dominio PAS (residuos 2 a 138), la región N-proximal (residuos 139 a 377) y la región de unión con el extremo intracelular del segmento transmembrana S1. Dentro del dominio N-proximal, se localiza la secuencia KIKER (residuos 362 a 366) en la que los aminoácidos cargados se han marcado con signos (+) o negativo (-), respectivamente. La isoforma hERG1b, carece de dominio PAS, comparte los aminoácidos del 1 al 35 y la región de unión con el S1, formada por los residuos 377 a 396. [Adaptada de Saenen y cols., 2006]

Regulación de la I_{Kr} en condiciones patológicas

Diversas condiciones patológicas que afectan al corazón pueden inducir cambios a largo plazo en la expresión y función de las subunidades que forman los canales hERG, no siendo estos cambios uniformes en las diferentes regiones del corazón lo que favorece la dispersión y alteración de la repolarización del PA (Pinto y Boyden, 1998; Volders y cols., 1999; Jiang y cols., 2000). En un modelo canino de infarto se ha demostrado la disminución en la densidad de la I_{Kr} y los niveles de ARNm de las subunidades hERG en los miocitos ventriculares (Jiang y cols., 2000). Sin embargo, 48 horas después del infarto, la densidad de la I_{Kr} aumenta en las células de Purkinje subendocárdicas, lo que ocasiona que se genere un gradiente en la repolarización ventricular. Esta heterogeneidad en la repolarización puede ser proarrítmica *per se* además de aumentar los efectos proarrítmicos de ciertos fármacos posinfarto de miocardio. Se ha demostrado que tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia inhiben la corriente generada por canales hERG y pueden causar prolongación del intervalo QT y arritmias ventriculares, ya que el ATP proveniente de la glucólisis y de la fosforilación oxidativa es crítico para la función de estos canales (Zhang y cols., 2003).

III.d. Propiedades farmacológicas de la I_{Kr}

La I_{Kr} es la diana terapéutica de los denominados fármacos antiarrítmicos de clase III, concretamente, del grupo de las metanosulfonanilidas (almokalant, dofetilida, D-sotalol, E-4031, ibutilida y MK-499) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Spector y cols., 1996; Nattel y Singh, 1999; Tamargo y cols., 2000). Estos fármacos inducen un bloqueo en los canales hERG dependiente de “uso” y de “voltaje”, accediendo a su sitio receptor cuando el canal se encuentra en un estado conformacional abierto (Kiehn y cols., 1996). Presentan una baja afinidad por el receptor cuando el canal está en estado inactivo o cerrado (Busch y cols., 1998; Mitcheson y cols., 2000a; Tseng, 2001; Tristani-Firouzi y Sanguinetti, 2003). La consecuencia de su unión al canal es la disminución de la densidad de la I_{Kr} y la prolongación de la DPA y del periodo refractario tanto a nivel auricular como ventricular (prolongación del intervalo QT), sin que se produzcan cambios en la velocidad de conducción del impulso eléctrico (intervalos AH, HV y PR). Sin embargo, una enorme lista de fármacos del arsenal terapéutico que incluye fármacos antihistamínicos, antifúngicos, antidepresivos, antipsicóticos, antibióticos, quimioterápicos antibacterianos o anticancerosos, tienen la capacidad de bloquear canales hERG dando lugar a lo que se conoce como Síndrome QT Largo adquirido (SQTLa).

A potenciales negativos, el cese de interacción entre algunas metanosulfonanilidas (dofetilida, MK-499) con los canales hERG resulta en un proceso lento e incompleto, lo que sugiere que el paso del canal a un estado conformacional cerrado cuando el E_m se encuentra en potenciales negativos atrapa a los fármacos localizados dentro de dicha cavidad (**Figura II.30**) (Carmeliet, 1992). Asimismo, los canales hERG poseen dos características peculiares en su estructura que explican la promiscuidad de su sitio receptor capaz de unirse a una enorme variedad de fármacos desde el punto de vista estructural (Mitcheson y cols., 2000b; Perry y cols., 2010). Por un lado, el tamaño del vestíbulo acuoso localizado en el interior del poro del canal es mayor que el que presentan otros canales K_v , lo que le permite albergar moléculas de diferentes tamaños (Mitcheson y cols., 2000b). Esta diferencia en el tamaño reside en que, en todos los canales K_v , existen uno o dos residuos aromáticos de prolina en el extremo carboxilo de cada segmento S6 los cuales se encargan de posicionar las α -hélice TM de cada subunidad de tal manera que se origine un codo que reduzca el tamaño de la cavidad interna (Del Camino y cols., 2000). Los canales hERG, sin embargo, carecen de dichos residuos, lo que favorece la formación de una cavidad mucho más grande y flexible que la del resto de canales de la misma familia.

Por otro lado, en los segmentos S6 se encuentran localizados dos residuos aromáticos, una tirosina y una fenilalanina, en las posiciones 652 y 656, respectivamente, que forman parte del sitio

receptor y que le confieren una alta afinidad en su interacción con fármacos que también poseen en su estructura anillos aromáticos (**Figura II.30**) (Mitcheson y cols., 2000a; Lees-Miller y cols., 2000). Estos residuos están presentes únicamente en estos canales, ya que las posiciones equivalentes en otros canales Kv están ocupadas por isoleucina y valina, respectivamente.

Varios modelos estructurales de homología basados en la cristalización del canal *KcsA*, han sugerido que los residuos Y652 y F656 de los canales hERG interaccionan con las metanosulfonanilidas y otros fármacos, como la terfenadina y la cisaprida, a través de la formación de uniones de tipo aromático o uniones π (Mitcheson y cols., 2000a).

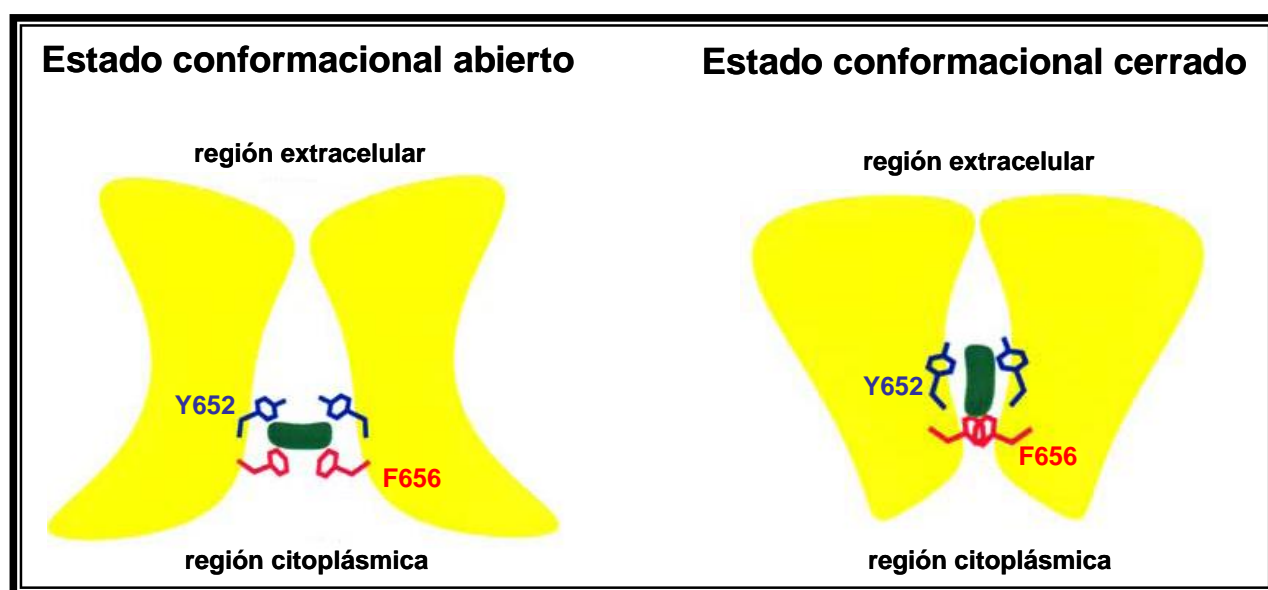


Figura II.30. Modelo de unión de las metanosulfonanilidas en la cavidad del dominio del poro de los canales hERG. Por claridad, sólo se representan, en color amarillo, dos de las cuatro subunidades que forman el canal. Los residuos aromáticos Y652 y F656 se indican con colores azul y rojo, respectivamente. En un estado conformacional abierto, la entrada del fármaco (molécula verde) produce un bloqueo de la cavidad del poro a través de la unión con los residuos Y652 y F656 localizados en el segmento S6 de los canales hERG. Si el canal pasa a un estado cerrado, el fármaco queda atrapado dentro del poro y retenido por un anillo formado entre las fenilalaninas de las diferentes subunidades. [Adaptada de Thomas y cols., 2006]

Existe un tercer factor que caracteriza las propiedades farmacológicas de los canales hERG, y es su extremadamente rápida inactivación, la cual posibilita ciertos cambios alostéricos en la cara interna de la boca del canal que ayudan a estabilizar la unión con diferentes fármacos como las metanosulfonanilidas (Lees-Miller y cols., 2000; Numaguchi y cols., 2000), pero no con otros como la quinidina (Kamiya y cols., 2001; Lees-Miller y cols., 2000).

Por último, diversos estudios han demostrado que algunos fármacos, que en principio actúan como agentes bloqueantes de canales hERG, pueden aumentar paradójicamente la densidad de la I_{Kr} (Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004; Perry y cols., 2010). En este caso, el sitio receptor no es el canónico descrito para los fármacos bloqueantes y no involucra a los residuos Y652 y F656. De esta

manera, un grupo reducido de fármacos (almokalant, azimilida y nifekalant), aumenta la corriente generada por canales hERG cuando éstos son activados por despolarizaciones débiles o cuando los fármacos son utilizados a bajas concentraciones (Carmeliet, 1993; Jiang y cols, 1999; Hosaka y cols., 2007). Este mecanismo de activación es denominado de “facilitación” y es debido a una modificación en el *gating* de los canales que produce un desplazamiento en la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales de membrana más negativos (Hosaka et al. 2007). No obstante, este efecto activador queda revertido al utilizar altas concentraciones de los fármacos y/o fuertes despolarizaciones. Por otro lado, existen algunos fármacos, como E-4031, cisaprida, terfenadino o astemizol, que, a pesar de tener un carácter bloqueante, son capaces de rescatar el tráfico de diversos mutantes de canales hERG asociados a SQT1 tipo 2 (SQT12), produciendo con ello un aumento en la I_{Kr} generada (Zhou y cols., 1998b).

El descubrimiento de este tipo de fármacos activadores de canales hERG ha ampliado el abanico de posibilidades sobre el diseño de compuestos químicos que puedan compensar la disminución de la I_{Kr} producida por el SQT12 ya sea corrigiendo defectos en el tráfico de los canales hacia la membrana o induciendo un efecto agonista, sin que aparezcan los efectos bloqueantes indeseados.

IV. La I_{Ks}

El componente lento de la corriente de salida de K^+ con rectificación tardía (I_{Ks}) participa fundamentalmente en la fase 3 de repolarización de los PA auriculares y ventriculares (Jespersen y cols., 2005; Tamargo y cols., 2004) y se considera la corriente principal implicada en el acortamiento de la DPA dependiente de frecuencia lo que implica que cuanto mayor es la frecuencia de disparo más breve es la DPA y el periodo refractario (Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Delpón y cols., 1995; Tamargo y cols., 2004).

La I_{Ks} se activa a potenciales más positivos de -30 mV y alcanza la mitad de su activación máxima a +20 mV aproximadamente (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Kurokawa y cols., 2001; Tristani-Firouzi y Sanguinetti, 2003). La cinética de activación de la I_{Ks} es extraordinariamente lenta y su amplitud máxima en estado estable (unas 10 veces mayor que la de la I_{Kr}) sólo se alcanza con despolarizaciones extremadamente prolongadas o bien a frecuencias de disparo muy altas (Mitcheson y Sanguinetti, 1999), mientras que su cinética de deactivación es muy lenta y dependiente de voltaje (Virag y cols., 2001).

Los canales que generan la I_{Ks} están formados por el ensamblaje de cuatro subunidades α Kv7.1 (antiguamente denominada KvLQT1) junto con dos subunidades auxiliares minK (Chen y

cols., 2003), unidas a través del dominio C-terminal de Kv7.1 (Sanguinetti y cols., 1996; Schmitt y cols., 2000; Plant y cols., 2014). Diversos estudios han demostrado que la expresión en sistemas heterólogos de la subunidad α Kv7.1 genera una corriente ($I_{Kv7.1}$) que se activa rápidamente y se inactiva lentamente (**Figura II.31B**) pero cuyas características son claramente diferentes a las de la I_{Ks} nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996; Lee y cols., 1997). Sin embargo, la coexpresión de subunidades Kv7.1 con subunidades minK (**Figura II.31A**), que por si solas no forma ningún canal funcional, genera una corriente que presenta características muy similares a la I_{Ks} nativa (**Figura II.31C**) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996).

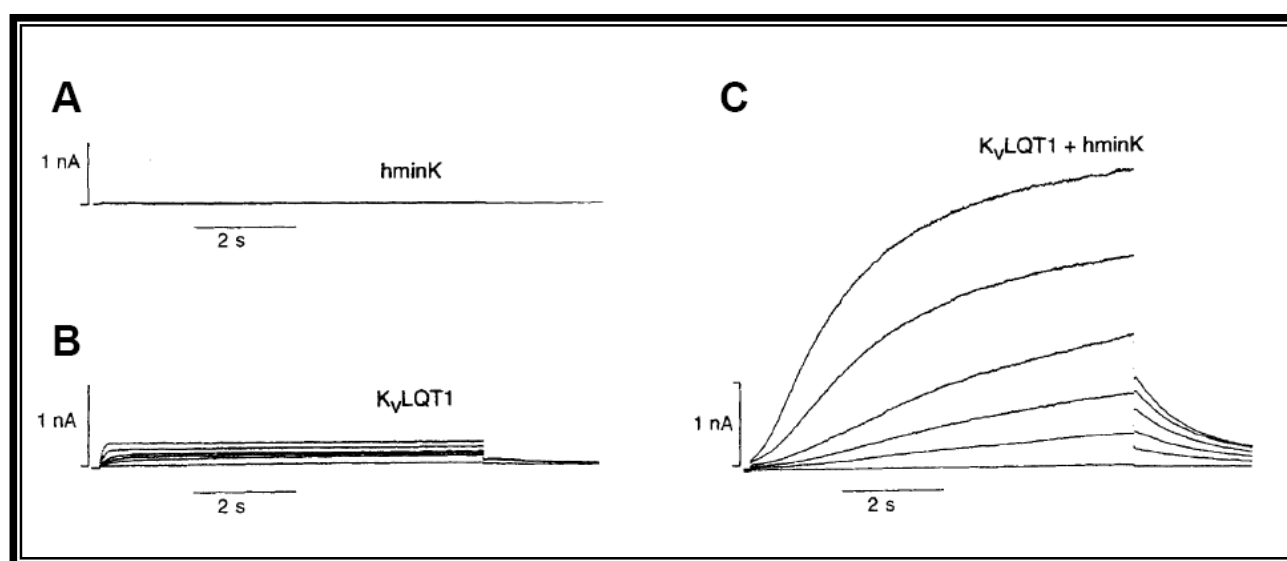


Figura II.31. Características de la I_{Ks} . (A y B) Corrientes registradas en células de mamífero transfectadas sólo con las subunidades minK (A) y Kv7.1 (B) o con ambas subunidades a la vez (C). [Adaptadas de Sanguinetti y cols., 1996]

3. SÍNDROMES CARDIACOS ARRITMOGÉNICOS PRIMARIOS

Hoy en día hay descritas una gran variedad de enfermedades congénitas asociadas a la presencia de mutaciones en los genes que codifican las subunidades α y β de los canales iónicos así como en aquellos que codifican cualquiera de las proteínas que forman el canalosoma de los diversos tipos de canales cardiacos. Dichas mutaciones modifican, en algunas ocasiones sólo de forma sutil, el funcionamiento, tráfico y/o expresión de los canales iónicos alterando las propiedades eléctricas de los miocitos cardiacos. Estos síndromes o canalopatías son enfermedades eléctricas puras no secundarias a una cardiopatía estructural subyacente (p.ej. miocardiopatía hipertrófica), que vienen determinados genéticamente y están caracterizados en muchas ocasiones por la aparición de arritmias potencialmente mortales, hablamos pues de síndromes arritmogénicos primarios (SAP). No obstante, en algunos síndromes conviven las eléctricas con alteraciones estructurales. Por ejemplo, es frecuente que los pacientes con mutaciones de los canales de Na^+ que

producen Síndrome de Brugada (SBr) desarrollen fibrosis intersticial intensa y alteraciones en el tejido de conducción (Coronel y cols., 2005). Las mutaciones pueden aumentar o disminuir la corriente iónica generada por el canal afectado, es decir, pueden producir *ganancia* o *pérdida de función*, respectivamente. Además de un origen genético, los síndromes arritmogénicos pueden tener un origen adquirido resultante de la exposición a diferentes fármacos, anticuerpos y/o toxinas (Lenhart y cols., 2007; Abriel y Zaklyazminskaya, 2013; Priori y cols., 2013). Es el caso del mencionado SQTLa debido al bloqueo de la I_{Kr} por fármacos de muy diverso tipo.

Los SAP pueden dar lugar a una afectación del nodo del seno, fibrilación auricular (FA) y desórdenes en el sistema de conducción intracardiaco (George, 2005; Remme y cols., 2008), pero son más graves aquellos asociados con la aparición de taquicardia o fibrilación ventricular porque pueden desencadenar muerte súbita cardíaca (MSC) (El-Sherif y Boutjdir, 2015). Este último grupo está formado por cinco síndromes principales: SQTLa, SBr, Síndrome QT Corto (SQTC), síndrome de Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica (TVPC) y, por último, el síndrome de Repolarización Temprana o precoz (SRT) (Abriel y Zaklyazminskaya, 2013; El-Sherif y Boutjdir, 2015; Wilde y Amin, 2017; Skinner y cols., 2019). Cada uno de ellos va a presentar un patrón electrocardiográfico característico y a dividirse, a su vez, en varios subtipos en función de las alteraciones genéticas responsables de los mismos (**Tabla II.10**). Todos ellos son considerados enfermedades raras, ya que su prevalencia es inferior al 1% de la población general. De los cinco, el más prevalente y mejor conocido es el SQTLa congénito con una prevalencia de 1:2500-1:5000 (Tester y cols., 2006; Goldenberg y cols., 2008; Schwartz y cols., 2009). El segundo más frecuente es el SBr (Benito y cols., 2008), cuya prevalencia se estima en 1:10000 en países como Estados Unidos, Rusia o los países europeos (Dupliakov y cols., 2007; Campuzano y cols., 2010), a pesar de que en países del sureste asiático y Japón parece ser más prevalente (Nademanee y cols., 1997). No obstante, estos datos han sido obtenidos basándose en el hecho de que dichos síndromes son de carácter monogénico con una herencia típica mendeliana, sin tener en cuenta la existencia de posibles combinaciones entre mutaciones de diferentes genes (*heterocigosis digénica*), o alelos de un mismo gen (*heterocigosis compuesta*), que dan lugar a fenotipos patológicos con diversos grados de gravedad (Westenskow y cols., 2004; Lin y cols., 2008; Wilde, 2010). Esta discrepancia podría significar que la prevalencia de síndromes como el SQTLa estaría muy subestimada (Zaklyazminskaya y Abriel, 2012). Además, otro de los aspectos a tener en cuenta es que, a veces existe una amplia variabilidad fenotípica para una mutación dada. Esta variabilidad se puede poner de manifiesto en los distintos portadores de una familia. Una posible explicación sería la presencia de las denominadas variantes polimórficas, también denominadas polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs o *Single Polymorphism Nucleotide*), que no son consideradas mutaciones al

encontrarse en al menos un 1% de la población, pero que al ser expresadas conjuntamente con la mutación patogénica, pueden alterar las manifestaciones fenotípicas (Lenhart y cols., 2007). Se habla entonces de “modificadores genéticos” de la expresividad fenotípica.

Por otro lado, debido a la penetrancia incompleta que presentan estos síndromes y que algunos de ellos se encuentran asociados a otras patologías somáticas o neurológicas, es muy común que sean diagnosticados erróneamente como enfermedades de origen epiléptico (Lenhart y cols., 2007; Priori y cols., 2013; El-Sherif y Boutjdir, 2015; Skinner y cols., 2019).

De manera general, las manifestaciones clínicas en este tipo de síndromes ocurren a una edad relativamente temprana en individuos con corazones estructuralmente normales. De hecho, actualmente han sido considerados una de las posibles causas de la aparición del síndrome de la muerte súbita del lactante (SIDS o *Sudden Infant Death Syndrome*) (Tester y Ackerman, 2005).

A pesar de que los SAP son responsables de aproximadamente la mitad de los casos de muerte súbita de origen cardíaco (Behr y cols., 2008), actualmente no existe una terapia curativa para este tipo de enfermedades. Aunque existen tratamientos farmacológicos que ayudan a prevenir la aparición de arritmias, el tratamiento más eficaz se basa en la implantación de un dispositivo desfibrilador automático (en inglés, *Implantable Cardioverter Defibrillator* o sus siglas ICD) (El-Sherif y Boutjdir, 2015).

A excepción del SQTL, que lo discutiremos con más detalle en el próximo apartado, en la **Tabla II.10** se muestran los genes involucrados en los principales SAP hereditarios.

Síndrome	Gen	Proteína	Corriente	Efecto
SÍNDROME DE BRUGADA (autosómico dominante)				
SBr1	<i>SCN5A</i>	Nav1.5	I_{Na}	↓
SBr2	<i>GPD1-L</i>	Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 1-like (GPD1-L)	I_{Na}	↓
SBr3	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2	$I_{Ca,L}$	↓
SBr4	<i>CACNB2B</i>	Cavβ2b	$I_{Ca,L}$	↓
SBr5	<i>SCN1B</i>	Navβ1	I_{Na}	↑
SBr6	<i>KCNE3</i>	MiRP2	I_K	↓
SBr7	<i>SCN3B</i>	Navβ3	I_{Na}	↓
SBr8	<i>HCN4</i>	HCN4	I_f	↓
SÍNDROME DE QT CORTO				
SQTC1	<i>KCNH2</i>	Kv11.1 (hERG)	I_{Kr}	↑
SQTC2	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	I_{Ks}	↑
SQTC3	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	I_{K1}	↑
SQTC4	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2	$I_{Ca,L}$	↓
SQTC5	<i>CACNB2B</i>	Cavβ2b	$I_{Ca,L}$	↓
SQTC6	<i>CACNA2D1</i>	Cavα2δ1	$I_{Ca,L}$	↓
SÍNDROME DE REPOLARIZACIÓN TEMPRANA				
-----	<i>KCNJ8</i>	Kir6.1	I_{KATP}	↑
-----	<i>CACNB2B</i>	Cavβ2b	$I_{Ca,L}$	↓
TAQUICARDIA VENTRICULAR POLIMÓRFICA CATECOLAMINÉRGICA				
TVPC1 (AD)	<i>RYR2</i>	RyR2	Liberación de Ca^{2+} desde el RS durante la diástole	↑
TVPC2 (AR)	<i>CASQ2</i>	Calsequestrina		↑
-----	<i>ANK2</i>	Anquirina-β (proteína de anclaje)		↑
TVPC3	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	I_{K1}	↑

Tabla II.10. Genes involucrados en los principales síndromes arritmogénicos primarios. AD: autosómico dominante. AR: autosómico recesivo. RS: Retículo sarcoplásmico. Las flechas ↑ y ↓ indican ganancia o pérdida de función, respectivamente.

3.1. Síndrome QT Largo congénito

3.1.1. Características principales y manifestaciones clínicas

El Síndrome QT Largo congénito (SQTLC) se trata de un SAP que comprende un grupo de trastornos de la repolarización cardíaca caracterizados por una prolongación excesiva y heterogénea del PA ventricular traducida como una prolongación del intervalo QT del ECG de 12 derivaciones (Mizusawa y cols., 2014; Tester y Ackerman, 2014; Nakano y Shimizu, 2016). El SQTLC se encuentra asociado con la aparición de arritmias ventriculares, la cuales pueden progresar a taquicardia ventricular polimórfica (TV) conocida como *torsade de pointes* (TdP) (el-Sherif y Turitto, 1999). En la práctica clínica, el TdP es uno de los síntomas más graves de la enfermedad y puede desencadenar en síncope (síntoma más común del SQTLC), o MSC por fibrilación ventricular en el individuo afectado. Típicamente estos eventos ocurren durante el ejercicio intenso o estrés emocional, y en menor proporción durante la etapa de sueño, y normalmente tienen lugar sin previo aviso.

Por lo general, el SQTLC afecta a niños y adultos jóvenes aparentemente sanos, preferentemente de género femenino. La edad media de inicio de los síntomas (síncope o MSC) son 12 años o incluso antes en las formas más graves de la enfermedad (Priori y cols., 2003). El SQTLC también es conocido por ser uno de los agentes etiológicos del síndrome de la muerte súbita del lactante (Schwartz y cols., 1998). De hecho, se ha demostrado que en el 10% de los casos, el lactante porta una mutación en uno de los genes asociados al desarrollo de SQTLC (Arnestad y cols., 2007).

Antiguamente, el SQTLC era dividido en dos variantes fenotípicas. Por un lado, en 1957, Jervell y Lange Nielsen describieron el síndrome que hoy día lleva su nombre, y que cursaba con sordera congénita, prolongación del intervalo QT en el ECG, mala respuesta al tratamiento con β -bloqueantes y una elevada incidencia de MSC por arritmias ventriculares en los primeros años de vida. El patrón de herencia era autosómico recesivo (Jervell y Lange-Nielsen, 1957). Por otro lado, entre 1963 y 1964, Romano y Ward describieron de forma independiente una alteración cardíaca similar pero que no cursaba con sordera congénita (Romano y cols., 1963). Este síndrome era más frecuente que el anterior y parecía heredarse de forma autosómica dominante, con una penetrancia muy variable (25-90%). De hecho, hasta un 30% de los portadores de la mutación asociada con la enfermedad podían cursar con un intervalo QT normal, aunque eran más susceptibles a desarrollar arritmias malignas que el resto de la población.

Actualmente, el síndrome Romano-Ward se caracteriza por una gran heterogeneidad genética. De hecho, se han identificado hasta 17 genes diferentes asociados con diversos tipos de SQTLC (Tabla II.11) (Skinner y cols., 2019). Si bien estos síndromes cursan con el mismo fenotipo (prolongación del intervalo QT y aumento en la dispersión de la repolarización ventricular que facilitan la aparición de pospotenciales tempranos y de arritmias por reentrada), presentan una fisiopatología, curso clínico, pronóstico y tratamiento distintos.

Nombre síndrome	Posición cromosómica	Nombre gen	Nombre proteína	Corriente
Síndromes tipo Romano-Ward (autosómico dominante)				
SQTL1	11p15.5	KCNQ1	Kv7.1	$I_{Ks} \downarrow$
SQTL2	7q35-36	KCNH2	Kv11.1	$I_{Kr} \downarrow$
SQTL3	3p21-24	SCN5A	Nav1.5	$I_{Na} \uparrow$
SQTL4	4q25-27	ANK2	Anquirina B	$I_{Na} \uparrow$
SQTL5	21q22.1-22.2	KCNE1	minK	$I_{Ks} \downarrow$
SQTL6	21q22.1-22.2	KCNE2	MiRP1	$I_{Kr} \downarrow$
SQTL7 (Anderson-Tawil)	17q23	KCNJ2	Kir2.1	$I_{K1} \downarrow$
SQTL8 (Timothy)	12p13.3	CACNA1C	Cav1.2	$I_{Ca,L} \uparrow$
SQTL9	3p25	CAV3	Caveolina 3	$I_{Na} \uparrow$
SQTL10	11q23.3	SCN4B	Subunidad auxiliar $\beta 4$	$I_{Na} \uparrow$
SQTL11	7q21-q22	AKAP9	Yotiao	$I_{Ks} \downarrow$
SQTL12	20q11.2	SNTA1	$\alpha 1$ -sintrofina	$I_{Na} \uparrow$
SQTL13	11q24.3	KCNJ5	Kir3.4	$I_{K,ACh} \downarrow$
SQTL14	14q24-q31	CALM1	Calmodulina 1	$I_{Ca,L} \uparrow$; $I_{Na} \uparrow$; $I_{Ks} \downarrow$
SQTL15	2p21.1-p21.3	CALM2	Calmodulina 2	$I_{Ca,L} \uparrow$; $I_{Na} \uparrow$; $I_{Ks} \downarrow$
SQTL16	19q13.2-q13.3	CALM3	Calmodulina 3	$I_{Ca,L} \uparrow$; $I_{Na} \uparrow$; $I_{Ks} \downarrow$
SQTL17 (autosómico recesivo)	-----	TRDN	Triadina	$I_{Ca,L} \uparrow$
Síndromes Jervell y Lange-Nielsen (autosómico recesivo)				
JLN1	11p15.5	KCNQ1	Kv7.1	$I_{Ks} \downarrow$
JLN2	21q22.1-22.2	KCNE1	minK	$I_{Ks} \downarrow$

Tabla II.11. Tipos de Síndrome QT Largo congénito. Actualmente se han identificado hasta 17 genes diferentes asociados con SQTLC tipo Romano-Ward (SQTL1-SQTL17) y 2 genes asociados al Síndrome Jervell y Lange-Nielsen (JLN1 y JLN2). En la tabla se muestra el tipo de síndrome junto con la posición cromosómica y el gen asociado a cada uno, así como la proteína y la corriente implicados en cada caso. Las flechas \uparrow y \downarrow indican que la enfermedad se asocia con un aumento o una disminución de cada corriente, respectivamente. [Adaptada de Nakano y Shimizu, 2016 y Skinner y cols., 2019]

Por otro lado, se han descrito además dos variantes, asociadas a los genes *KCNQ1* y *KCNE1*, que dan lugar a dos formas graves de SQTLC cuyos fenotipos se asocian con el síndrome Jervell y Lange-Nielsen (JLN1 y JLN2, respectivamente) (Tabla II.11) (Schwartz y cols., 2006). La mayoría de las mutaciones (80%) se encuentran en el gen *KCNQ1*, siendo las localizadas en el gen *KCNE1* asociadas a un curso más benigno de la enfermedad.

De todos los SQTLC descritos hasta la fecha, los más frecuentes son el SQTLC tipo 1 (SQTLC1), asociado a mutaciones en el gen *KCNQ1*, el SQTLC2, asociado a mutaciones en el gen *KCNH2*, y el SQTLC tipo 3 (SQTLC3), asociado a mutaciones en el gen *SCN5A* (Goldenberg y cols., 2008). Es más, dichos síndromes abarcan el 75% de todos los casos de SQTLC, lo que a su vez se divide en rangos del 30-35%, 25-40% y 5-10% de los casos para el SQTLC1, SQTLC2 y SQTLC3, respectivamente (Ackerman y cols., 2011). Además, diversos estudios han descrito varios de los desencadenantes de los síntomas que caracterizan a cada uno de ellos. Así, en el SQTLC1 por ejemplo los eventos cardiacos tienen lugar durante etapas de estrés emocional o durante la realización de ejercicio físico intenso, destacando actividades deportivas como la natación (Schwartz y cols., 2001). En el SQTLC2, los desencadenantes suelen ser de tipo sonoro, como el sonido de la alarma de un reloj o el timbre de un teléfono (Wilde y cols., 1999), a pesar de que también pueden observarse otros como estrés emocional o el periodo postparto (Schwartz y cols., 2001; Khositseth y cols., 2004). Recientemente se han descrito numerosos casos de epilepsia relacionados con el SQTLC2 (39% de los casos), en los cuales sólo en un 10% aparecen convulsiones de tipo epiléptico (Johnson y cols., 2009). Esto puede ser debido a que el gen *KCNH2* también es expresado en cerebro. Obviamente, en tales casos es muy importante un correcto diagnóstico diferencial con el fin de elegir el tratamiento adecuado. De hecho, a menudo el SQTLC es tratado erróneamente como epilepsia debido a la aparición de convulsiones generalizadas secundarias al desarrollo de taquicardia ventricular del tipo TdP.

Por último, ha sido observado que los desencadenantes de los síntomas en el caso del SQTLC3 aparecen frecuentemente durante el descanso o etapa de sueño (Schwartz y cols., 2001; Takigawa y cols., 2012).

El SQTLC presenta una penetrancia baja y muy variable (55%, 70% y 80% en los SQTLC1, SQTLC2 y SQTLC3, respectivamente), lo que indica que 2 de cada 5 portadores de una mutación patogénica tienen un intervalo QT normal (definido como < 400 ms) (Priori y cols., 1999; Priori y cols., 2003). Esto ocurre incluso en pacientes con historia previa de síncope, aunque sean más susceptibles a desarrollar arritmias ventriculares malignas que el resto de la población. Algunos pacientes (aproximadamente el 50% de los casos de SQTLC) pueden permanecer asintomáticos durante mucho tiempo (Ackerman, 1998; Schwartz, 2000), de modo que la MSC puede ser la primera manifestación clínica en aparecer. Otros pacientes presentan mareos o sensación de desvanecimiento (presíncope), síncope y convulsiones y la MSC puede aparecer antes de los 10 años, si bien la frecuencia y la intensidad de los síntomas pueden disminuir hasta llegar a la edad adulta.

Además de los eventos cardiacos, algunos tipos de SQTLC se encuentran asociados a un fenotipo en el que también se incluyen otros síntomas característicos como debilidad muscular y

dismorfismo facial en el SQTl tipo 7 (SQTl7 o síndrome de Andersen-Tawil), malformaciones físicas, sindactilia y alteraciones del desarrollo neuronal-cognitivo en el SQTl tipo 8 (SQTl8 o síndrome de Timothy), o una pérdida auditiva neurosensorial bilateral profunda en el síndrome de Jervell y Lange-Nielsen (JLN1 y JLN2).

3.1.2. Diagnóstico de SQTlc

El diagnóstico de SQTlc es establecido principalmente en base a la prolongación del intervalo QT observado en el ECG en ausencia de condiciones ajenas a la enfermedad conocidas también por prolongar dicho intervalo (por ejemplo, exposición a diferentes fármacos o drogas de abuso). Ya que el intervalo QT es dependiente de la frecuencia cardíaca, su interpretación en la clínica requiere de un ajuste mediante fórmulas que tengan en cuenta este parámetro y que dan lugar a lo que se denomina como intervalo QT corregido (QTc) (Rabkin y Cheng, 2015). De todas ellas, una de las más antiguas, y a la vez más utilizada, es la desarrollada por Bazett en 1920 y modificada por Taran y Szilagyi en 1947 (Bazett, 1920; Taran y Szilagyi, 1947). Dicha fórmula es definida mediante la ecuación $QTc = QT/\sqrt{RR}$, donde QTc es el intervalo QT corregido para la frecuencia y RR es el intervalo desde el comienzo de un complejo QRS hasta el comienzo del siguiente complejo QRS del ECG, medido en segundos. Sin embargo, esta fórmula no suele ser muy exacta, sobrevalorando el intervalo a frecuencias altas e infravalorándolo a frecuencias bajas. Por tanto, en busca de corregir este problema, se han propuesto otras ecuaciones que se ajustan mejor a los cambios y variabilidad de la frecuencia cardíaca. De todas ellas, las más conocidas son la fórmula de Fridericia (Fridericia, 1920), la fórmula de Framingham (Sagie y cols., 1992), la fórmula de Hodges (Hodges, 1983), o incluso la fórmula de Rautaharju, donde se tienen en cuenta además otros parámetros como la edad y el sexo del individuo (Rautaharju y cols., 2014). Aun así, en la práctica clínica actual se sigue utilizando el intervalo QTc obtenido mediante la fórmula de Bazett como parámetro de referencia para el diagnóstico del SQTl.

En general, se considera prolongado un intervalo QTc superior a 440 ms, fronterizo o límite cuando existe una prolongación del QTc entre 450 y 470 ms, y patológico cuando el QTc es superior a 480 ms en mujeres o 470 ms en hombres. Hay que tener en cuenta que los valores del intervalo QTc se van a medir a partir de la realización del ECG en estado de reposo. Aun así, la duración del QTc puede variar en cada paciente, incluso llegando a ser normal en algunas circunstancias (aunque siguen presentado riesgo de desarrollar síncope por arritmias ventriculares). De hecho, aproximadamente un 25% de los individuos diagnosticados con SQTl a través de la identificación de una variante patogénica en uno de los genes asociados con la enfermedad (**Tabla**

II.11) poseen un intervalo QTc dentro de valores normales. En este caso, se trataría de un SQT1 “enmascarado” (Goldenberg y cols., 2011).

Por otro lado, existen varios factores a tener en cuenta que pueden prolongar el intervalo QTc:

- Fármacos y drogas de abuso que prolongan el intervalo QT.
- Hipopotasemia.
- Ciertas patologías neurológicas incluyendo sangrado en el espacio subaracnoideo.
- Enfermedad estructural cardíaca.

Además del intervalo QTc, Moss y colaboradores propusieron en el año 1995 que el patrón de la onda T del ECG también podía variar según el fenotipo del SQT1, ayudando con ello al diagnóstico. Así, el SQT1 cursaría con una onda T más ancha, el SQT2 con una onda T de baja amplitud y mellada (bífida), y el SQT3 con un segmento ST prolongado y una onda T estrecha y picuda (**Figura II.32**) (Moss y cols., 1995).

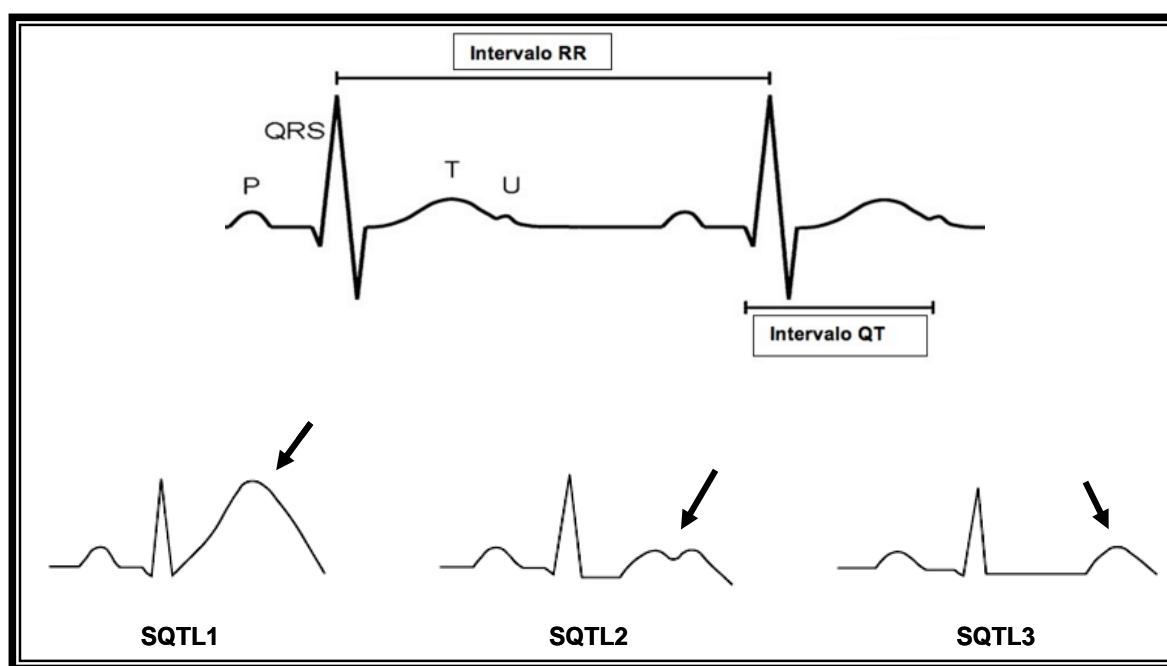


Figura II.32. Esquema del patrón electrocardiográfico normal (parte superior) o con la morfología característica de las ondas T (parte inferior, señaladas con flechas) presentes en el SQT1 (onda T ancha), SQT2 (onda T bífida) o SQT3 (segmento ST prolongado y onda T estrecha), respectivamente.

Otras características que se pueden visualizar en el ECG y que nos ayudan al diagnóstico de SQT1 son (Schwartz y cols., 1993; Zhang y cols., 2000): **a)** La dispersión del intervalo QT, que refleja las diferencias (dispersión) regionales en la repolarización ventricular. La repolarización en

el corazón es normalmente heterogénea debido a la diferencia en la duración del PA en las diferentes regiones (ventrículo derecho *versus* izquierdo o epicardio *versus* endocardio) como consecuencia de la distinta expresión de los diversos canales iónicos. La dispersión del intervalo QT es de 48 ± 18 ms en sujetos normales y este valor aumenta de forma significativa en pacientes con SQTl, estando este incremento relacionado con un riesgo mayor de presentar arritmias ventriculares malignas. **b)** Alteraciones de la onda T, clasificadas como alternancia en la polaridad y/o variaciones en la morfología (apariencia bifásica) y en la amplitud o “muescas”. Esta *alternancia de la onda T* es definida como la variación latido a latido observada en dichos parámetros que aparece en ritmo sinusal, sin variaciones en el complejo QRS, y es utilizada como indicador de inestabilidad eléctrica que refleja la dispersión regional en la repolarización. De hecho, en ocasiones precede al desarrollo de fibrilación ventricular (FV). **c)** Signos de disfunción del nodo sinusal (SQTl4), bradicardia sinusal (SQTl1 y SQTl3) y/o pausas sinusales. **d)** Bloqueo auriculoventricular de segundo grado tipo 2:1, el cual aparece en el 4-5% de los pacientes, particularmente en aquellos que presentan SQTl2, SQTl3 y SQTl8, y se asocia a una alta mortalidad a pesar del tratamiento con β -bloqueantes y/o un desfibrilador automático implantable (DAI). **e)** *Torsades de pointes*: esta taquicardia ventricular polimórfica presenta un aspecto sinusoide, con una torsión del intervalo QRS alrededor de la línea isoeletrica, cambios del eje de 180° y una frecuencia cardíaca en torno a 150-300 latidos por minuto (lpm).

Además del ECG, en el diagnóstico de SQTl es importante tener en cuenta la historia clínica del paciente. Una historia personal de síncope, paro cardíaco o MSC resucitada en un niño o adulto joven podría llevarnos a sospechar de un SQTl. De hecho, aquellos individuos que sufren un síncope durante el primer año de vida (Spazzolini y cols., 2009) o en aquellos que se encuentran por debajo de los 7 años de edad (Priori y cols., 2004), son los que padecen un riesgo más alto de ser diagnosticados con la enfermedad.

Asimismo, en el 85% de los casos de SQTlc, el paciente va a portar una mutación heredada directamente de uno de los padres, siendo muy pequeño el porcentaje (15%) en los que la mutación aparece *de novo*. Esto hace que el estudio de la historia familiar del paciente también adquiera relevancia en el diagnóstico. Familiares con síncope, paro cardíaco o MSC, también podrían llevarnos a la sospecha de SQTl.

El año 1993, Schwartz y colaboradores propusieron un sistema de puntuación para el diagnóstico de SQTl atendiendo a varios criterios como la historia clínica y familiar y posibles alteraciones observadas en el ECG (Schwartz y cols., 1993). En la **Tabla II.12** se muestra un resumen de dicho sistema, el cual fue actualizado por Schwartz y Crotti en el año 2011 (Schwartz y Crotti, 2011).

Parámetros			Puntos
ECG ¹	Intervalo QTc ²	≥ 480 ms	3
		460 – 479 ms	2
		450 – 459 ms (en varones)	1
		QTc ≥ 480 ms al cuarto minuto de recuperación de un test de ejercicio	1
	Torsade de Pointes ³		2
	Alternancia de la onda T		1
	Onda T mellada en 3 derivaciones		1
	Frecuencia cardiaca lenta para su edad ⁴		0.5
Historia clínica	Síncope ³	Con estrés	2
		Sin estrés	1
	Sordera congénita		0.5
Historia familiar	A) Miembros de la familia con SQTL definido ⁵		1
	B) MSC inexplicada antes de los 30 años ⁵		0.5

Tabla II.12. Sistema de puntuación para el diagnóstico clínico de SQTL. [Adaptada de Schwartz y Crotti, 2011]

Puntuación:

≤ 1.0 punto = probabilidad baja de SQTL

1.5 – 3.0 puntos = probabilidad intermedia de SQTL

≥ 3.5 puntos = probabilidad alta de SQTL

Notas:

1. En la ausencia de fármacos o alteraciones conocidas por afectar estas características electrofisiológicas
2. QTc calculado por la fórmula de Bazett donde $QTc = QT/\sqrt{RR}$
3. Mutuamente excluyentes. Un mismo miembro de una misma familia
4. Frecuencia cardiaca en reposo $<$ que segundo percentil por edad
5. El mismo miembro de la familia no puede estar en A) y en B)

Así pues, el diagnóstico de SQTL se establece cuando el sujeto cumple una o más de las siguientes características (Priori y cols., 2013):

- Una puntuación en el sistema ≥ 3.5 (**Tabla II.12**) en ausencia de una causa secundaria que provoque la prolongación del intervalo QTc.
- La presencia de un intervalo QTc ≥ 500 ms en repetidos ECGs y, de nuevo, en ausencia de una causa secundaria que provoque la prolongación de dicho intervalo.

- La identificación de una variante patogénica en uno de los genes asociados al desarrollo de SQTL (**Tabla II.11**).

Asimismo, también se considera un diagnóstico de SQTL cuando el paciente en cuestión no presenta ninguna mutación en los genes asociados con la enfermedad, pero muestra en repetidos ECGs un intervalo QTc de entre 480 y 499 ms y ha sufrido previamente algún episodio de síncope documentado (Priori y cols., 2013).

En general, este sistema de puntuación es adecuado para el diagnóstico de SQTL típicos. Sin embargo, como ya hemos mencionado, existe un porcentaje de personas que presentan un SQTL “enmascarado” con un ECG en reposo aparentemente normal. En estos casos, dicho sistema no es válido y, por tanto, se hace necesario proceder a la realización de diversas pruebas clínicas complementarias que tengan como fin desenmascarar la prolongación del intervalo QT. Estas pruebas incluyen la repetición del ECG, nuevamente en reposo y durante la realización de ejercicio controlado (ergometría o prueba de esfuerzo) (Shimizu y cols., 1991; Goldenberg y cols., 2006; Horner y cols., 2011; Sy y cols., 2011), la colocación de un Holter durante 24-48 horas, el registro del ECG al pasar de un estado en decúbito supino a la bipedestación (test de ortostatismo o de bipedestación) (Viskin y cols., 2010) o la realización de un test de adrenalina (Ackerman y cols., 2002). La infusión de adrenalina debe llevarse a cabo siempre en hospitales o centros especializados en la inducción y control de arritmias. Además de servir para desenmascarar un SQTL, este test ayudar a predecir el genotipo (SQTL1, SQTL2 o SQTL3) y mejora el diagnóstico clínico (Shimizu y cols., 2004). De esta manera, puede verse que en pacientes con SQTL1, la adrenalina prolonga de forma muy marcada el intervalo QTc en el momento en que se produce el aumento máximo de la frecuencia cardíaca y esta prolongación persiste en el tiempo. En pacientes con SQTL2, el fármaco también prolonga el intervalo QTc cuando la respuesta taquicardizante es máxima, pero posteriormente éste se acorta hasta alcanzar el valor basal. Por el contrario, en los pacientes con SQTL3 la prolongación del intervalo QTc es mucho menos marcada (**Figura II.33**).

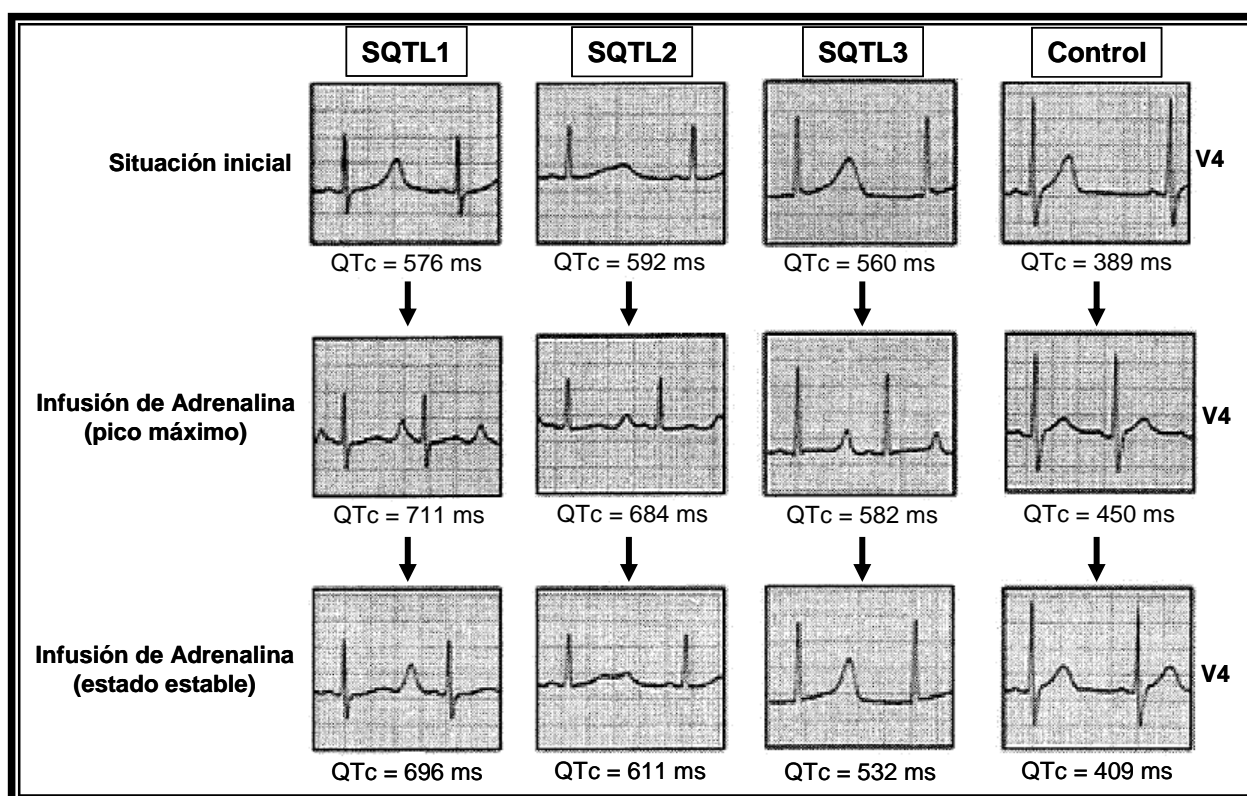


Figura II.33. Test de adrenalina realizado en un individuo control (derecha) y en tres pacientes con SQTL1, SQTL2 y SQTL3, respectivamente. En la imagen se muestran los ECGs con los cambios registrados en el intervalo QTc producidos tras la administración de una infusión de adrenalina en cada uno de los sujetos. [Adaptada de Shimizu y cols., 2004]

Además del intervalo QTc y del resto de pruebas complementarias, el diagnóstico de SQTLc está basado en la realización de diversos análisis genéticos con el fin de identificar la variante (o variantes) génicas implicadas en la aparición de la enfermedad. Como hemos dicho, actualmente se conocen hasta 17 genes asociados con diferentes tipos de SQTL (**Tabla II.11**) (Tester y Ackerman, 2014; Nakano y Shimizu, 2016; Skinner y cols., 2019). Sin embargo, aproximadamente en el 20% de las familias con un diagnóstico de SQTL no se han llegado a identificar mutaciones patogénicas en alguno de estos genes. Es más, hay pacientes en los que el diagnóstico de SQTL ha sido asociado no solo a una sino a varias mutaciones patogénicas que pueden aparecer o bien en los dos alelos de un mismo gen (*heterozigosis compuesta*) o bien presentarse en heterozigosis en dos genes diferentes (*heterozigosis digénica*). En estos casos el SQTL es generalmente asociado a fenotipos más severos, con intervalos QTc más prolongados y una mayor incidencia en la aparición de eventos cardiacos (Westenskow y cols., 2004; Tester y cols., 2005; Itoh y cols., 2010).

Los análisis genéticos pueden ser de diversos tipos, incluyendo el uso de paneles multigénicos, un estudio funcional y detallado de cada uno de los genes por separado basándose en

el fenotipo patológico de cada individuo, o análisis genómicos más exhaustivos, como la secuenciación masiva del exoma o del genoma completo de los individuos afectados.

3.1.3. Características genotípicas del SQTLC

En todos los tipos de SQTLC, las anomalías genéticas son responsables de la prolongación de la duración del PA bien porque disminuyen las corrientes de K^+ implicadas en la fase de repolarización (mutaciones de pérdida de función) o bien porque aumentan las corrientes de Na^+ (concretamente el componente tardío o $I_{Na,L}$) o de Ca^{2+} implicadas en la fase de meseta (mutaciones de ganancia de función), resultando en todos los casos en una prolongación del intervalo QT del ECG (**Figura II.34**) (Giudicessi y Ackerman, 2013; Mizusawa y cols., 2014).

Como se ha mencionado, los tres primeros genes identificados en el SQTLC fueron *KCNQ1* (SQTLC1), *KCNH2* (SQTLC2), y *SCN5A* (SQTLC3) que codifican la subunidad α formadora del poro de los canales que generan la I_{Ks} , I_{Kr} e I_{Na} , respectivamente. Mientras que las mutaciones en *KCNQ1* y *KCNH2* producen una pérdida de función de los canales de potasio Kv7.1 y hERG, respectivamente, las mutaciones en el gen *SCN5A* producen una ganancia de función de los canales de sodio Nav1.5 (Goldenberg y cols., 2008). Curiosamente, en el caso del SQTLC3, se ha observado en algunos pacientes un solapamiento fenotípico entre dicho síndrome y otros, como el SBr, asociados a la misma variante del gen *SCN5A* (Makita y cols., 2008).

Sin embargo, no todos los SQTLC descritos hasta la fecha son debidos a mutaciones en los canales iónicos cardiacos. Como vamos a describir a continuación, también se han identificado numerosas variantes localizadas en proteínas accesorias encargadas de regular la expresión y función de éstos, así como su transporte y anclaje en la membrana plasmática del cardiomiocito (Ackerman y Mohler, 2010).

3.1.3.a. SQTLC asociados a la disminución de las corrientes de K^+

Además del SQTLC1, existen otros 4 tipos de SQTLC asociados con una disminución de la I_{Ks} que incluyen el SQTLC5, SQTLC11, JLN1 y JLN2 (**Figura II.34** y **Tabla II.11**). El SQTLC5 está relacionado con mutaciones en el gen *KCNE1* que codifica la subunidad auxiliar MinK. Dichas variantes alteran el tráfico hacia la membrana de los canales Kv7.1 lo que conlleva a una disminución de la amplitud de la I_{Ks} (Harmer y cols., 2010).

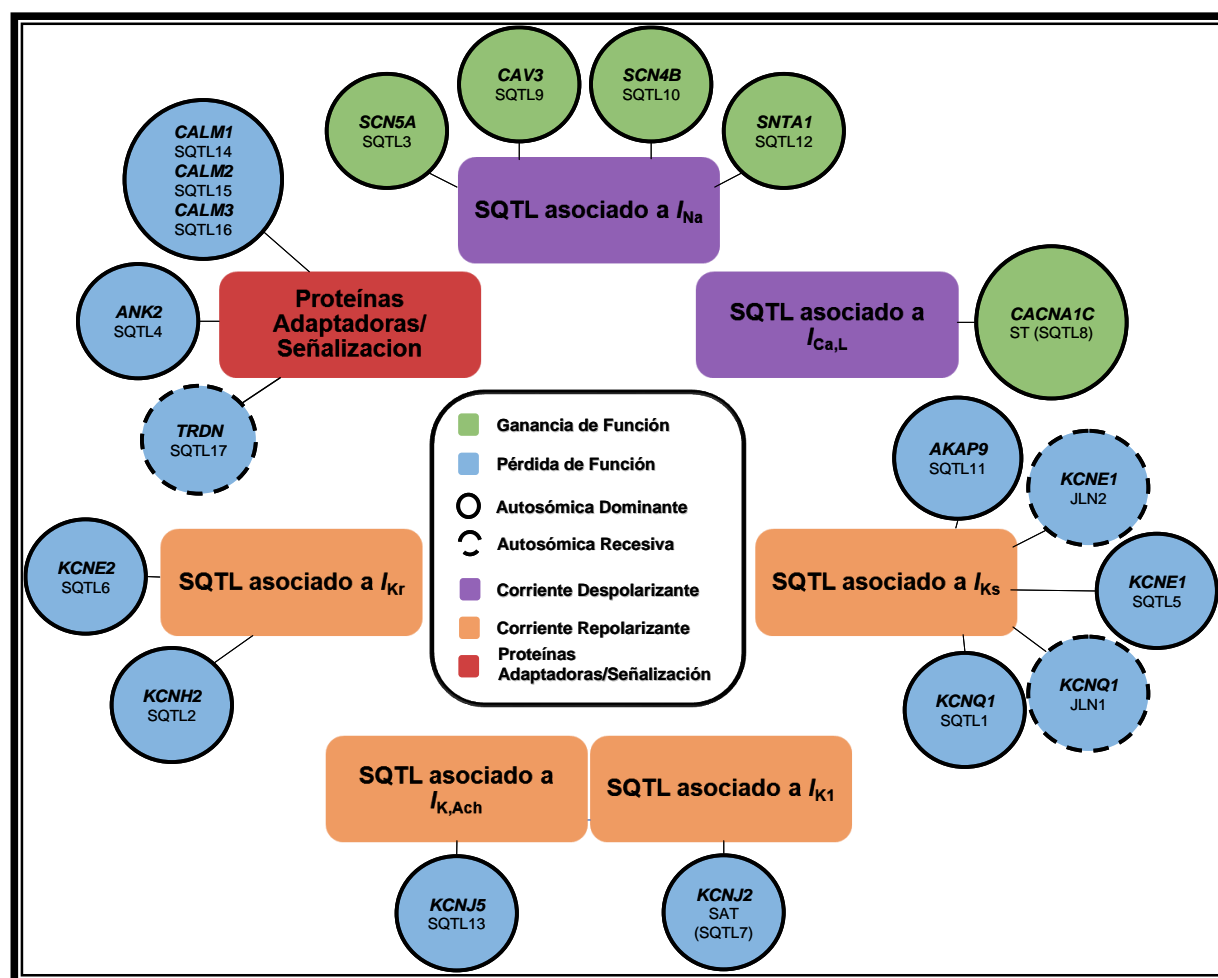


Figura II.34. Representación esquemática de los diferentes tipos de SQTLc asociados a diversas corrientes y los respectivos genes implicados. En una primera clasificación, los síndromes son divididos en función de si están asociados a alteraciones en corrientes despolarizantes (rectángulos morados), corrientes repolarizantes (rectángulos naranjas) o alteraciones en proteínas adaptadoras y de señalización (rectángulo rojo). Los genes implicados en la aparición de SQTL se clasifican en función de si las mutaciones encontradas son de pérdida (círculos azules) o ganancia (círculos verdes) de función. Las líneas continuas indican que los síndromes son heredados de manera autosómica dominante mientras que las líneas discontinuas indican herencia autosómica recesiva. ST: Síndrome de Timothy; SAT: Síndrome de Andersen-Tawil. [Adaptada de Giudicessi y Ackerman, 2013]

El SQTL11, por su parte, se encuentra asociado a mutaciones en el gen *AKAP9*, el cual codifica la proteína de anclaje Yotiao responsable de controlar la actividad de la PKA y modular la respuesta de la I_{Ks} a la estimulación β -adrenérgica (Marx y cols., 2002). Las variantes en dicha proteína reducen la interacción entre ésta con los canales Kv7.1, disminuyendo con ello la fosforilación, y por tanto la activación de éstos inducida por la PKA (Chen y cols., 2007).

Por otro lado, existen 2 tipos de SQTLc asociados con una disminución en la I_{Kr} , el ya mencionado SQTL2 y el SQTL6. Mientras que el primero de ellos será discutido con más detalle en el apartado 1.2, el SQTL6 está relacionado con mutaciones en el gen *KCNE2*, el cual codifica la subunidad auxiliar MiRP1. la interacción de los canales hERG con las proteínas MiRP1 mutadas producen la alteración del *gating* de los canales Kv11.1 disminuyendo la I_{Kr} (Lu y cols., 2003).

3.1.3.b. SQTLC asociados al aumento de la corriente de Na^+

Además del SQTLC3, existen diversos tipos de SQTLC asociados con un aumento en la amplitud de la $I_{\text{Na,L}}$. Estos síndromes incluyen el SQTLC9, el SQTLC10 y el SQTLC12 (**Figura II.34** y **Tabla II.11**).

Vatta y colaboradores identificaron varias mutaciones en el gen *CAV3*, el cual codifica la proteína integral de membrana caveolina-3, asociadas con la aparición de SQTLC9. La caveolina-3 es capaz de unirse a los canales Nav1.5 (Yarbrough y cols., 2002) y modular la corriente generada por ellos por una vía independiente de AMPc. Las mutaciones *CAV3* aumentan de 2 a 3 veces la I_{Na} sin modificar el *gating* del canal (Vatta y cols., 2006).

El SQTLC10 se asocia a diversas mutaciones en el gen *SCN4B*, que codifica la subunidad auxiliar $\beta 4$ de los canales de Na^+ . Dichas variantes aumentan la amplitud de la $I_{\text{Na,L}}$ al desplazar la dependencia de voltaje de la inactivación de los canales hacia voltajes positivos (Medeiros-Domingo y cols., 2007).

Por último, varios autores identificaron una serie de mutaciones en el gen *SNTA1*, el cual codifica la proteína de anclaje $\alpha 1$ -sintrofina, asociadas al desarrollo de SQTLC12. La $\alpha 1$ -sintrofina es una proteína muy importante en la unión de los canales Nav1.5 a la membrana lateral de los cardiomiocitos. Las mutaciones en *SNTA1* liberan la inhibición de la óxido nítrico sintasa neuronal por la ATPasa de Ca^{2+} (PMCAb) de la membrana plasmática, lo que se traduce en un aumento en la amplitud de la I_{Na} y de la $I_{\text{Na,L}}$ a través de la S-nitrosilación del canal de Na^+ (Ueda y cols., 2008; Wu y cols., 2008; Cheng y cols., 2009).

3.1.3.c. SQTLC asociados al aumento de la corriente de Ca^{2+}

El fenotipo más grave de SQTLC es síndrome de Timothy (SQTLC8) asociado a mutaciones en el gen *CACNA1C*, el cual codifica los canales Cav1.2 responsables de generar la $I_{\text{Ca,L}}$ (**Figura II.35** y **Tabla II.11**). Dichas mutaciones van a producir un retraso en la cinética de inactivación de los canales, lo que favorece el aumento de la $I_{\text{Ca,L}}$, lo en último término, se traduce en una prolongación del PA cardíaco con la consiguiente aparición de arritmias potencialmente mortales.

El síndrome de Timothy es muy poco frecuente por su alta mortalidad y por las manifestaciones multisistémicas que aparecen, entre las que se incluye enfermedad congénita cardíaca, sindactilia, inmunodeficiencia, anomalías cognitivas y autismo (Dixon y cols., 2012). En los últimos años se han descrito casos de SQTLC8 con mutaciones en *CACNA1C* asociadas a un

fenotipo que no se corresponde con el síndrome de Timothy (Boczek y cols., 2013; Fukuyama y cols., 2014).

3.1.3.d. Otros tipos de SQTLe

El SQTLe4 está relacionado con mutaciones con pérdida de función en el gen *ANK2* que codifica la anquirina B (**Figura II.34** y **Tabla II.11**) (Mohler y cols., 2003), una proteína de anclaje necesaria para la correcta localización del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1), la ATPasa Na^+/K^+ -ATP, el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato ó IP_3 (IP_3R) y los canales Nav1.5. Las mutaciones en la anquirina B dificultan la interacción de ésta con el resto de proteínas a las que regula, produciendo alteraciones en las concentraciones intracelulares de Na^+ y Ca^{2+} , y facilitando con ello la aparición de postpotenciales y arritmias durante la estimulación adrenérgica (Ackerman y Mohler, 2010).

El SQTLe7, también denominado síndrome de Andersen-Tawil, está asociado a mutaciones en el gen *KCNJ2*, el cuál codifica los canales Kir2.1 responsables de generar la I_{K1} (**Figura II.34** y **Tabla II.11**). Dichas variantes producen una disminución de los niveles de expresión de los canales y de la corriente generada por ellos, prolongando la fase final del PA cardíaco. El SQTLe7 se trata de una enfermedad multisistémica poco frecuente que, además de cursar con la prolongación del intervalo QT asociado a la aparición de arritmias ventriculares (TV, MSC), está caracterizado por una serie de síntomas como parálisis muscular periódica y malformaciones físicas como estatura baja, escoliosis, orejas de implantación baja, hipertelorismo, raíz nasal amplia, micrognatia, clinodactilia, braquidactilia y sindactilia (Plaster y cols., 2001; Tristani-Firouzi y cols., 2002; Nguyen y cols., 2013).

El SQTLe13 ha sido identificado en un portador de una mutación en el gen *KNCJ5*, que codifica la subunidad Kir3.4 que genera la $I_{K, \text{ACh}}$ (**Figura II.34** y **Tabla II.11**) (Yang y cols., 2010). Por tanto, sólo se ha descrito en una familia.

Una forma maligna de SQTLe se ha descrito en niños con mutaciones en los genes *CALM1* y *CALM2* que codifican la calmodulina (Crotti y cols., 2013). Los portadores presentan paros cardíacos recurrentes secundarios a taquiarritmias ventriculares, un intervalo QTc muy prolongado (> 600 ms), evidencia de un miocardio eléctricamente inestable (con alternancias de la onda T) y bloqueo AV intermitente 2:1. La mayoría de los portadores presentan además déficits neurológicos (epilepsia, retrasos en el desarrollo) de intensidad variable que podrían atribuirse a una lesión cerebral secundaria a las paradas cardíacas o posiblemente a una mayor susceptibilidad a lesiones neuronales como consecuencia de la insuficiencia circulatoria. La calmodulina actúa como sensor de Ca^{2+} en la inactivación Ca^{2+} -dependiente de los canales tipo L en los miocitos cardíacos

(Peterson y cols., 1999). Los defectos en la función de la calmodulina pueden prolongar la repolarización debido a las alteraciones de la inactivación de los canales de Ca^{2+} o a la alteración en la regulación de los canales de Na^+ que conduce a un aumento de la corriente despolarizante durante la fase de meseta del PA. Por otro lado, los canales Kv7.1 también requieren de la calmodulina para su actividad (Shamgar y cols., 2006). Por tanto, la inhibición de la calmodulina disminuye la I_{Ks} y retrasa la repolarización, estableciendo las condiciones para la aparición de postpotenciales tempranos y de actividad desencadenada. La inactivación de los canales cardíacos de Na^+ también requiere de calmodulina y la interrupción de esta interacción puede provocar disfunción de dichos canales y trastornos de la conducción (Potet y cols., 2009). Recientemente se ha descrito una mutación en el gen *CALM3*, el cual codifica igualmente la calmodulina, asociada a la aparición de un nuevo tipo de SQTl (SQTl16) (**Figura II.34** y **Tabla II.11**) (Reed y cols., 2015; Landstrom y cols., 2017).

Por último, el gen más recientemente asociado a la aparición de un nuevo tipo de SQTl (SQTl17) ha sido *TRDN* (**Figura II.34** y **Tabla II.11**) (Altmann y cols., 2015) previamente relacionado con la aparición de TVPC tipo 5 (TVPC5) (Roux-Buisson y cols., 2012). Dicho gen codifica las triadinas, proteínas capaces de formar complejos con el receptor de rianodina (RyR2) y el de IP_3 (IP_3R) en la membrana del RE de los cardiomiocitos, regulando la liberación del Ca^{2+} en el músculo cardíaco y el acoplamiento excitación-contracción. Existen 3 isoformas de triadinas, denominadas como Trisk95, Trisk51 y Trisk32 acorde a sus pesos moleculares, todas ellas expresadas a partir del *splicing* alternativo del mismo gen *TRDN* (Terentyev y cols., 2007). Trisk32, también conocida como CT1, es la principal isoforma, aunque no la única, expresada en el tejido cardíaco (Kobayashi y Jones, 1999). Diversas mutaciones en el gen *TRDN* se han asociado a la aparición de SQTl17, caracterizado por presentar con una herencia autosómica recesiva. La pérdida de función de la triadina reduce el mecanismo de retroalimentación negativa de los canales de Ca^{2+} , resultando en un aumento de la corriente generada por éstos dando lugar a la sobrecarga de iones Ca^{2+} en el interior celular. Ello conduce a un aumento en la frecuencia de liberación del Ca^{2+} desde el RE y a la prolongación en último término de la duración del PA, con el consiguiente desarrollo de arritmias ventriculares (TV) (Chopra y cols., 2009; Altmann y cols., 2015).

3.1.4. Pronóstico del SQTlc

La evolución de los pacientes con SQTlc es muy variable, dependiendo de la edad, el sexo, la duración del intervalo QTc, el genotipo del SQTl y la respuesta al tratamiento (**Figura II.35**) (Priori y cols., 2003; Giudicessi y Ackerman, 2013). En general, las guías (Giudicessi y Ackerman,

2013) consideran que el riesgo de sufrir algún evento cardíaco antes de los 40 años es bajo (<30%) en pacientes con un QTc<500 ms, SQT1 o varones con SQT2. El riesgo es moderado (30-50%) en pacientes con un QTc<500 ms si son varones con un SQT3 o mujeres con un SQT2/3. También se considera riesgo moderado si el intervalo QTc es ≥ 500 ms y se trata de mujeres con SQT3. Fenotípicamente, están dentro de este rango aquellos individuos que tengan intervalos QTc prolongados entre 500 y 549 ms pero que hayan sufrido menos de dos eventos cardíacos antes de los 18 años. El riesgo es alto (>50%) en pacientes con QTc ≥ 500 ms si presentan un SQT1/2 o varones con un SQT3, y que hayan presentado 2 o más eventos cardíacos (pero menos de 10) antes de los 18 años de edad. Por último, el riesgo es extremadamente alto ($\geq 80\%$) en aquellos pacientes diagnosticados con síndrome de Timothy (SQT8), aquellos que presenten mutaciones patogénicas en más de uno de los alelos del gen *KCNQ1*, como puede darse en el caso del síndrome de Jervell y Lange-Nielsen (JLN1 y JLN2) (Bdier y cols., 2017) y en aquellos pacientes que hayan sufrido 10 o más eventos cardíacos antes de los 18 años.

Por otro lado, se ha descrito que las mutaciones con cambio de sentido son las más comunes (78%, 67%, y 89% en el gen *KCNQ1*, *KCNH2* y *SCN5A*, respectivamente) y su localización determina el riesgo del paciente a sufrir eventos cardíacos. Por su parte, las mutaciones sin cambio de sentido tienen un valor predictivo >99% independientemente de su localización (Kapa y cols., 2009).

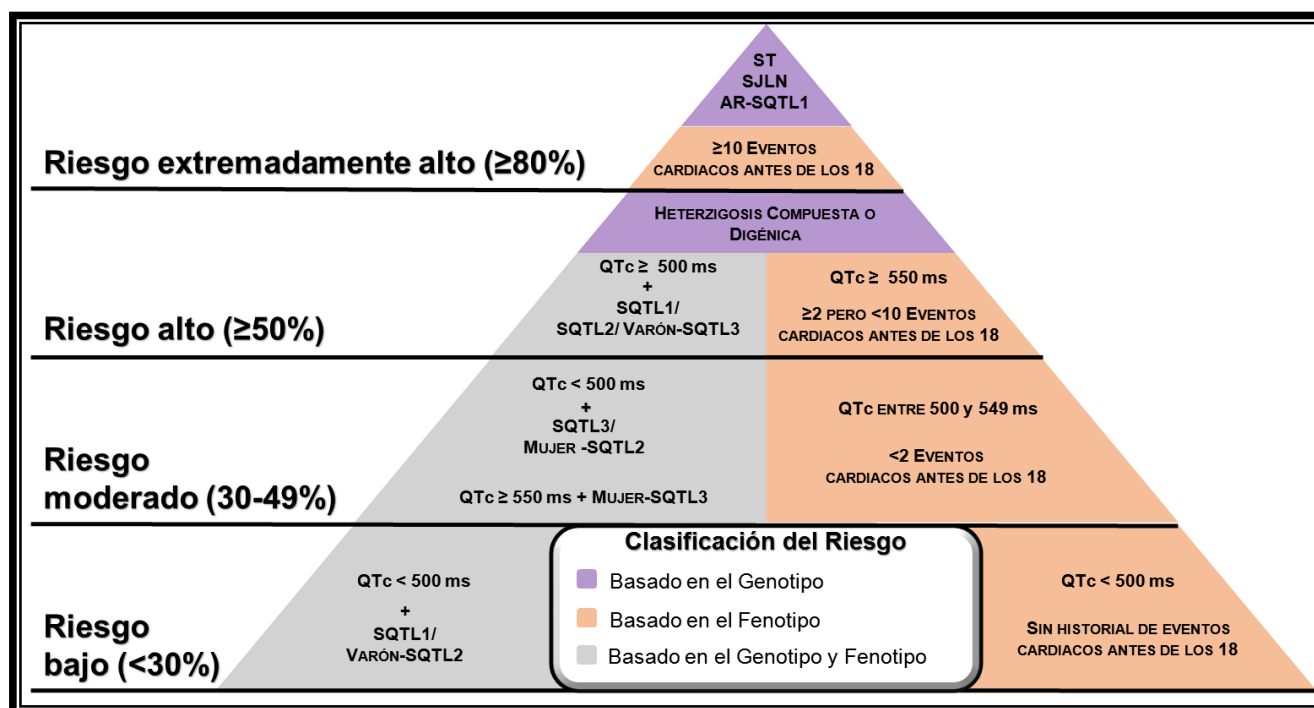


Figura II.35. Clasificación del riesgo de sufrir eventos cardíacos antes de los 40 años de edad en pacientes diagnosticados con SQTc. Estos eventos incluyen episodios de síncope, convulsiones, o muerte súbita cardíaca (MSC). La clasificación está basada en el genotipo del paciente (recuadros morados), fenotipo (recuadros naranjas) o una mezcla de ambos (recuadros grises). [Adaptada de Giudicessi y Ackerman, 2013]

3.1.5. Tratamiento del SQTLC

Los β -bloqueantes son el tratamiento de elección para los pacientes con SQTLC ya que son los fármacos más eficaces en la prevención de las recurrencias de eventos cardíacos y MSC. Son indicados tanto en individuos sintomáticos como asintomáticos que presenten un intervalo QTc ≥ 470 ms (14). En aquellos sujetos asintomáticos con un QTc < 470 ms el tratamiento es opcional, pero debería considerarse que al menos un 10% de los individuos con SQTLC y asintomáticos desarrollarán síntomas en el futuro.

En general, el tratamiento con β -bloqueantes es muy bien tolerado por la mayoría de individuos y reduce el riesgo de sufrir eventos cardíacos en más del 95% de los casos de SQTLC1, entre el 70 y el 80% de los casos de SQTLC2 y en aproximadamente el 80% de los casos de SQTLC3 (Moss y cols., 2000; Priori y cols., 2004; Vincent y cols., 2009; Wilde y cols., 2016). El efecto protector de estos fármacos se ha correlacionado con la supresión del tono simpático, que es uno de los factores desencadenantes de TdP, el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo-L y la disminución de la dispersión transmural del intervalo QTc (Moss y cols., 2000; Gemma y cols., 2011; Bennett y cols., 2014). La supresión del tono simpático hace que los β -bloqueantes sean más efectivos en los pacientes con SQTLC1 (90% de los pacientes tratados permanecen asintomáticos tras 5.4 años) en los que los eventos potencialmente mortales aparecen con mayor frecuencia durante los periodos de activación simpática.

A pesar de que originalmente se sugirió que el efecto de los β -bloqueantes dependía del tipo de SQTLC, un estudio posterior demostró que el efecto protector es dependiente del tipo de fármaco utilizado (Chockalingam y cols., 2012) de forma que en el SQTLC1 y SQTLC2, los efectos de β -bloqueantes como nadolol y propranolol fueron claramente superiores al de otros utilizados como el metoprolol.

En general, el nadolol es el β -bloqueante más efectivo para el SQTLC y, de hecho, debería ser utilizado como tratamiento de primera línea en la prevención tanto primaria como secundaria de los síntomas en individuos de alto riesgo (Chockalingam y cols., 2012; Abu-Zeitone y cols., 2014). Por su parte, el bisoprolol podría ser una alternativa en aquellos individuos con SQTLC de bajo riesgo y asintomáticos (Fazio y cols., 2013; Steinberg y cols., 2016). El atenolol, sin embargo, no es recomendado por la mayoría de expertos ya que actualmente no se asocia al acortamiento del intervalo QTc en individuos diagnosticados con SQTLC1 o SQTLC2 (Steinberg y cols., 2016). Además, estudios previos han identificado diversos efectos adversos al utilizar este fármaco en niños (Trippel y Gillette, 1990; Chatrath y cols., 2004).

Con el fin de controlar la eficacia y los posibles efectos adversos, es necesario la realización de evaluaciones periódicas y la regulación de las dosis de β -bloqueantes empleadas en todos los individuos con SQTl, especialmente niños que se encuentren en edad de crecimiento.

Además de los β -bloqueantes, existe una terapia farmacológica específica para aquellos individuos diagnosticados con SQTl3. En este caso se trata de utilizar diversos fármacos que tengan como diana la inhibición del componente tardío o $I_{Na,L}$ de la corriente de Na^+ . Para ello, se ha sugerido emplear varios bloqueantes de los canales de Na^+ (Schwartz y cols., 1995; Windle y cols., 2001; Moss y cols., 2005) como algunos antiarrítmicos de clase Ib (mexiletina, lidocaína), de clase Ic (flecainida) o la ranolazina (Chorin y cols., 2016; Mazzanti y cols., 2016). Mientras que el efecto de la flecainida y la ranolazina parece depender de las propiedades biofísicas de la o las mutaciones en los canales de Na^+ , el efecto de la mexiletina parece ser independiente de éstas (Chorin y cols., 2016; Mazzanti y cols., 2016; Chorin y cols., 2018). La ranolazina, un nuevo fármaco antianginoso que bloquea de forma selectiva la $I_{Na,L}$, acorta la duración del intervalo QT en pacientes con SQTl3 a concentraciones a las que no modifica la frecuencia, la contractilidad o la velocidad de conducción cardiacas (Moss y cols., 2008). En todos los casos, el empleo de estos fármacos debería tomarse en cuenta especialmente en aquellos pacientes con SQTl3 de alto riesgo. De hecho, en estos pacientes con intervalos $QTc \geq 500$ ms suelen tratarse previamente con β -bloqueantes y, si al cabo de aproximadamente 90 minutos, se consigue acortar el QT en más de 40 ms, entonces se procede a la combinación de éstos con bloqueantes de los canales de Na^+ como la mexiletina (Chockalingam y cols., 2012; Schwartz y cols., 2012).

En aquellos pacientes con SQTl que han sufrido MSC resucitada o en aquellos que, aun estando bajo tratamiento con β -bloqueantes, han presentado episodios repetidos de arritmias ventriculares graves y síncope, resulta de elección la colocación de un DAI (del inglés *implantable cardioverter defibrillator* o ICD), independientemente del genotipo (Priori y cols., 2013; Priori y cols., 2015). Además, las guías recomiendan el DAI para la prevención primaria de la MSC en pacientes con factores de alto riesgo, como por ejemplo aquellos con SQTl1, SQTl2 o SQTl3 con un intervalo $QTc \geq 500$ ms y en los que los eventos cardiacos aparecen antes de los 7 años de edad (Epstein y cols., 2008). También es adecuado en pacientes diagnosticados con JLN y síndrome de Timothy o en los que el tratamiento con β -bloqueantes está contraindicado (por ejemplo, asmáticos) (Priori y cols., 2013; Priori y cols., 2015). Sin embargo, el DAI no previene los eventos arrítmicos en pacientes con SQTl2/3 y en pacientes muy jóvenes su implantación puede ser problemática, ya que se acompaña de más complicaciones que en los adultos. Con el paso del tiempo, las complicaciones relacionadas con la colocación del DAI son relativamente comunes e incluyen disfunción del aparato, descargas o *shocks* inapropiados e infecciones justo en la zona de

implantación (Olde Nordkamp y cols., 2016). Es por ello que la decisión de implantar un DAI debe ser tomada cuidadosamente por personal clínico experto y deben realizarse evaluaciones regulares con el fin de comprobar su correcto funcionamiento.

Otra alternativa es la colocación de un marcapasos para evitar los episodios de bradicardia y las pausas sinusales, especialmente en pacientes con SQT1 y SQT2, en los que las TdP pueden iniciarse tras dicha pausa. Sin embargo, los datos con marcapasos se limitan a un pequeño número de pacientes (Moss y cols., 1991). La combinación de un marcapasos y β -bloqueantes puede ser beneficiosa en pacientes de alto riesgo, sobre todo cuando se trata de pacientes adolescentes. Las guías establecen que la estimulación permanente está indicada en pacientes con TV inducidas tras una pausa, exista o no una prolongación del intervalo QT (Epstein y cols., 2008).

Por otro lado, en los pacientes diagnosticados con SQT1 (intervalo QTc > 500 ms) que no responden a los β -bloqueantes y que presentan episodios repetidos de arritmias ventriculares graves y síncope, la denervación simpática cardíaca izquierda (DSCI) puede considerarse también como tratamiento alternativo. Este procedimiento quirúrgico previene la aparición de TV al extirpar el ganglio estrellado izquierdo, ya que se interrumpe la fuente principal de noradrenalina liberada en el corazón y con ello aumenta el umbral de fibrilación ventricular y la refractariedad ventricular. En un estudio realizado por Schwartz y colaboradores se demostró que, tras 8 años de seguimiento en 147 pacientes con SQT1 a los que se les había realizado DSCI, los eventos cardíacos se redujeron en aproximadamente un 90% de los casos (Schwartz y cols., 2004).

El DSCI parece ser más efectivo en pacientes con SQT1 que en aquellos con SQT2 o SQT3 (Ackerman, 2015). Asimismo, la aparición de efectos adversos es bastante común, afectando hasta al 95% de pacientes que son sometidos al tratamiento (Waddell-Smith y cols., 2015). Debido a ello y a la naturaleza invasiva del procedimiento, el DSCI es actualmente empleado únicamente como terapia de rescate para el tratamiento de individuos con SQT1 de muy alto riesgo, incluyendo aquellos en los que aparecen arritmias refractarias a pesar de estar bajo tratamiento controlado y los que sufren múltiples *shocks* debido a un mal funcionamiento del DAI. Asimismo, este tratamiento podría ser apropiado en el caso de pacientes jóvenes con formas agresivas de SQT1 y en cuyo caso la implantación de un DAI está contraindicada o es técnicamente inviable (Schwartz y cols., 2004; Priori y cols., 2013).

Como última opción en el tratamiento de SQT1 hay que mencionar el trasplante de corazón. Sin embargo, este procedimiento rara vez se utiliza para tratar este tipo de enfermedades, sólo en casos selectos y extremos. En un estudio reciente realizado en la clínica Mayo (Minnesota, EEUU) incluyendo a 349 niños y adolescentes con SQT1, se determinó que la incidencia del trasplante de corazón fue del 0.9%, es decir, únicamente 3 pacientes fueron transplantados. Los 3 pacientes

habían sido diagnosticados con SQT3 y previamente ya habían sido sometidos a una cirugía de denervación simpática cardíaca bilateral (Kelle y cols., 2017).

3.1.5.a. Prevención de los síntomas

Además del tratamiento profiláctico disponible y ya comentado en el apartado anterior, los individuos diagnosticados con SQT3 deberán evitar las siguientes circunstancias:

- Administración de fármacos/drogas que causan una prolongación del intervalo QT o provocan TdP.
- Desequilibrio electrolítico asociado a una prolongación del intervalo QTc. Es muy importante identificar si en el paciente existe un desequilibrio electrolítico asociado a la aparición de diarreas, vómitos, condiciones metabólicas específicas, o la realización de dietas de manera inapropiada.
- Pacientes con SQT1 deberán evitar la realización de actividad física intensa, incluyendo deportes competitivos como la natación sin supervisión. En pacientes con SQT2 se debe reducir la exposición a ruidos intensos tales como alarmas de relojes o timbres de teléfonos. La participación en deportes competitivos tampoco es recomendada. En general, todos aquellos individuos con SQT3 que deseen participar en este tipo de deportes deben ser evaluados periódicamente por personal médico experto (Johnson y Ackerman, 2012; Priori y cols., 2013).
- En la medida de lo posible, evitar acontecimientos que provoquen estrés emocional.

- Prevención en el embarazo: el periodo postparto se encuentra asociado con un riesgo alto de padecer eventos cardíacos, especialmente en aquellas mujeres diagnosticadas con SQT2. En estos casos, el tratamiento con β -bloquantes durante los 9 meses posteriores al parto, ha sido asociado con una disminución en el número de arritmias ventriculares y síncope (Seth y cols., 2007).

- Precaución en aquellos individuos con SQT3 y con antecedentes clínicos de asma, hipotensión ortostática, depresión, y diabetes mellitus, ya que estas patologías podrían ser exacerbadas con un tratamiento a base de β -bloquantes.

- A pesar de que la incidencia de arritmias es baja durante intervenciones específicas tales como cirugías, endoscopias, parto inducido, o cirugías dentales, se deberá monitorizar el ECG durante la realización de tales procedimientos.

3.2. Síndrome QT Largo adquirido

Además del SQTLC, existe el denominado SQTLa adquirido (SQTLa), caracterizado por la prolongación del intervalo QT del ECG a consecuencia de una alteración en la fase de repolarización cardíaca debido a situaciones concretas tales como la exposición a determinados fármacos, la presencia de alteraciones metabólicas o desequilibrios electrolíticos (hipomagnesemia, hipopotasemia, hipocalcemia), hipotiroidismo, hipotermia o una bradicardia muy marcada (pacientes con bradicardia sinusal o bloqueo auriculoventricular) (Cho y cols., 2015; El-Sherif y cols., 2018). Además recientemente se han identificado diversos pacientes con SQTLa debido a la presencia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Lazzerini y cols., 2015; Boutjdir y cols., 2016; Lazzerini y cols., 2016).

Al igual que en el resto de SQTLa, los síntomas del SQTLa también pueden desembocar en la aparición de arritmias ventriculares graves como TdP y MSC (Roden, 2004; Roden y Viswanathan, 2005).

Cualquiera de los factores recién mencionados puede causar directamente SQTLa o bien contribuir de manera secundaria a aumentar el riesgo de padecer SQTLa inducido por la exposición a fármacos. De hecho, éste último es la causa más común de SQTLa y el principal mecanismo implicado es el bloqueo de los canales hERG responsables de generar la I_{Kr} (Roden y Viswanathan, 2005), a pesar de que en teoría la interacción de los fármacos con otros canales iónicos que igualmente participan en la fase de repolarización cardíaca también podría desencadenar la aparición de dicho síndrome. Sin embargo, y como se ha mencionado en el apartado anterior de “*Propiedades farmacológicas de la I_{Kr}* ” (página 78), los canales hERG van a poseer dos características peculiares en su estructura que explican la promiscuidad de su sitio receptor para unirse a una enorme variedad de fármacos que incluyen, además de antiarrítmicos, fármacos con fines terapéuticos no cardíacos como antihistamínicos, antifúngicos, antidepresivos, antipsicóticos, antibióticos, quimioterápicos antibacterianos o anticancerosos (**Tabla II.13**) (Mitcheson y cols., 2000; Perrin y cols., 2008; Perry y cols., 2010; Kallergis y cols., 2012). Por un lado, el tamaño del vestíbulo acuoso localizado en el interior del poro del canal es mayor que el que presentan otros canales de la misma familia debido a la ausencia de dos prolinas. Esto favorece además que la cavidad sea mucho más flexible para acomodar los diferentes fármacos en el interior. Por otro lado,

dentro de dicha cavidad se encuentran localizados dos residuos aromáticos (Y652 y F656) que van a conferir a los canales una alta afinidad por la unión a fármacos que también posean en su estructura anillos aromáticos (Lees-Miller y cols., 2000; Mitcheson y cols., 2000a; Fernandez y cols., 2004; Roden y cols., 2005).

Fármacos Antiarrítmicos
Clase IA (quinidina, procainamida, disopiramida)
Clase III (dofetilida, ibutilida, sotalol, amiodarona)
Clase IV (verapamilo)
Fármacos procinéticos
Cisaprida
Antibióticos y quimioterápicos antimicrobianos
Macrólidos
Eritromicina
Claritromicina
Fluoroquinolonas
Antiprotozoarios
Pentamidina
Antipalúdicos (antimaláricos)
Cloroquina
Fármacos antipsicóticos
Neurolepticos tipo fenotiazinas
- Tioridazina
- Clorpromazina
Neurolepticos tipo butirofenonas
- Haloperidol
Fármacos misceláneos
Trióxido arsénico
Metadona

Tabla II.13. Fármacos asociados al desarrollo de SQTLa. Todos ellos prolongan el intervalo QT del ECG al interactuar con los canales hERG y bloquear su función en la generación de la I_{Kr} . [Adaptada de Kallergis y cols., 2012]

La administración de más de un fármaco que prolonga la repolarización cardiaca aumenta el riesgo de desarrollar SQTLa. Además, en la mayoría de los casos dicho aumento es debido a la aparición de alteraciones metabólicas a consecuencia de la interacción entre los respectivos fármacos, más que por un simple efecto aditivo sobre la I_{Kr} .

Por otra parte, existen múltiples factores de riesgo asociados a la aparición de SQTLa (**Tabla II.14**). Se ha demostrado que en la mayoría de pacientes afectados por la enfermedad coinciden al menos uno de estos factores junto con la exposición al fármaco desencadenante de los síntomas (Kallergis y cols., 2012).

Género femenino
Hipopotasemia
Bradicardia
Cardioversión eléctrica reciente de FA
Fallo cardíaco congestivo
Hipertrofia ventricular izquierda
Altas concentraciones de los fármacos (a excepción de los antiarrítmicos de clase IA, el riesgo aumenta proporcionalmente a la concentración del fármaco)
Intervalo QT prolongado en condiciones basales
SQTL subclínico o enmascarado
Presencia de polimorfismos en los genes que codifican los canales iónicos cardíacos
Hipomagnesemia severa

Tabla II.14. Factores de riesgo descritos por estar asociados a la aparición de SQTLa. FA: Fibrilación Auricular.
[Adaptada de Kallergis y cols., 2012]

Asimismo, la susceptibilidad a padecer SQTLa puede verse influenciada por diferentes mutaciones genéticas (Mahida y cols., 2013). De hecho, los familiares de primer grado de pacientes diagnosticados con SQTLe son más susceptibles a desarrollar una prolongación del intervalo QT inducida por fármacos que aquellos individuos no emparentados (Kannankeril y cols., 2005).

La incidencia del SQTLa en una población dada es muy difícil de estimar. Aun así, Molokhia y colaboradores realizaron un estudio en pacientes franceses y observaron que aproximadamente entre el 5 y el 7% de los casos de TV, FV o MSC fueron diagnosticados como SQTLa asociado a TdP (Molokhia y cols., 2008).

El tratamiento del SQTLa incluye en primer lugar la identificación del fármaco causante de la prolongación del intervalo QT y su consecuente retirada. Así mismo se tratará de corregir si existiese alguna afectación metabólica secundaria como hipopotasemia o hipomagnesemia.

En la mayoría de casos, los episodios de TdP suelen ser efímeros y terminan de manera espontánea. Sin embargo, si apareciese algún episodio más prolongado en el tiempo, la estabilidad hemodinámica del paciente podría verse comprometida y entonces se haría necesario realizar una cardioversión eléctrica en el foco generador de las arritmias.

El tratamiento a corto plazo disponible se centra en prevenir la recurrencia de arritmias tipo TdP e incluye la administración en el paciente de sulfato de magnesio por vía intravenosa o la estimulación cardíaca temporal transvenosa, normalmente con isoproterenol. La primera de las acciones es considerada el tratamiento de elección durante un episodio agudo de TdP, independientemente de los niveles de magnesio que el paciente tenga en suero (Banai y Tzivoni, 1993). El mecanismo por el cual el magnesio previene la aparición de arritmias recurrentes no está del todo claro, pero probablemente su acción esté mediada por el bloqueo de las corrientes de Na^+ y de Ca^{2+} . Si además el paciente presenta hipopotasemia, se deberá inyectar el bolo de magnesio junto con potasio con el fin de mantener unos niveles plasmáticos óptimos de este último.

La estimulación cardíaca temporal transvenosa, por su parte, va a resultar efectiva en acortar el intervalo QTc y prevenir la aparición de TdP recurrentes, especialmente cuando éstas son seguidas de una pausa en la frecuencia cardíaca o bradicardia (Khan, 2002). El isoproterenol por vía intravenosa puede ser útil ya que al incrementar la frecuencia cardíaca acorta la duración de los PA ventriculares, disminuye la dispersión de la repolarización ventricular y suprime los pospotenciales tempranos que generan las arritmias tipo TdP.

Por último, el tratamiento a largo plazo es requerido en muy pocas ocasiones. Aquellas condiciones que predisponen al desarrollo de un desequilibrio electrolítico deben ser corregidas. Asimismo, en pacientes diagnosticados con síndrome del nodo del seno o bloqueo auriculoventricular y bradicardia, debe valorarse la implantación de un marcapasos permanente (Viskin, 2000).

3.3. Síndrome QT Largo Tipo 2

El SQT2 es el segundo tipo de SQTc más común después del SQT1 y se encuentra asociado a mutaciones en el gen *KCNH2* que cursan con un defecto o pérdida de función de las subunidades hERG, lo que conlleva a una disminución o incluso ausencia de I_{Kr} . Como consecuencia, se produce un retraso en la fase de repolarización del PA cardíaco traducido como una prolongación del intervalo QT del ECG, que predispone al paciente a padecer arritmias ventriculares graves y potencialmente mortales (TV y MSC) (Sanguinetti, 2010; Smith y cols., 2016; Bohnen y cols., 2017). A menudo, los episodios de síncope o convulsiones aparecen repentinamente tras presenciar eventos específicos como el sonido intenso de una alarma de despertador o el timbre de un teléfono, así como estados fisiológicos de estrés emocional o el periodo postparto (**Figura II.36**) (Wilde y cols., 1999; Schwartz y cols., 2001; Khositseth y cols., 2004). En general, el diagnóstico principal se realiza en base a la prolongación del intervalo QTc

observado en el ECG, descartando previamente un posible origen asociado a la exposición de fármacos que también prolonguen dicho intervalo (SQTLa), junto con otros parámetros como la morfología de las ondas T, que en el caso del SQTL2 se asocian con ondas de baja amplitud y melladas (bífidas) (Moss y cols., 1995).

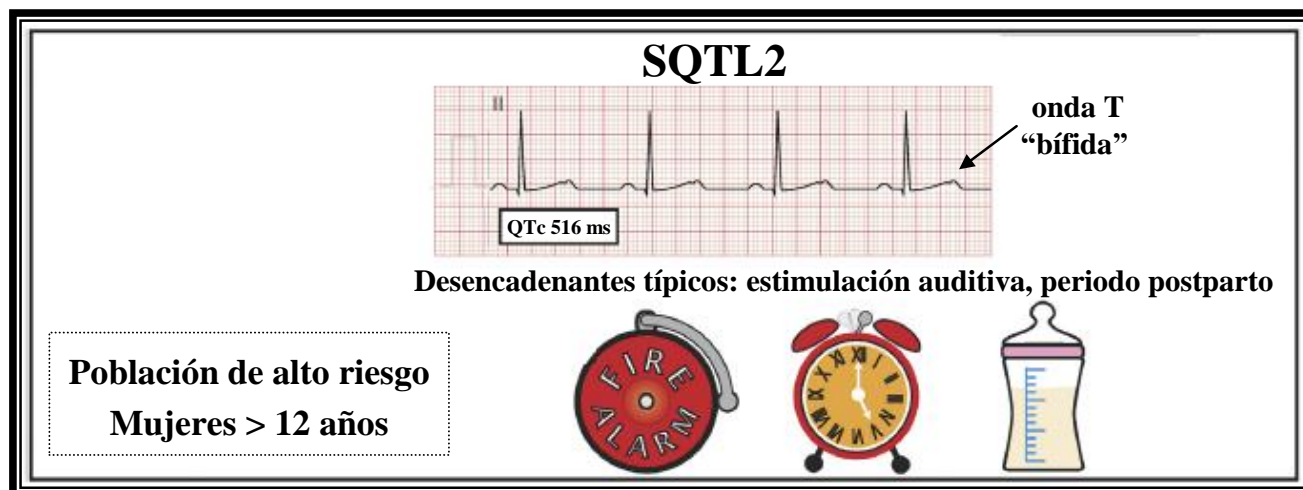


Figura II.36. Características principales del SQTL2. [Adaptada de Skinner y cols., 2019]

Las mutaciones en homocigosis en el gen *KCNH2* implicadas en la aparición de SQTL2 son extremadamente raras y resultan en muerte fetal o en una prolongación muy severa del intervalo QT al nacer (Hoorntje y cols., 1999; Johnson y cols., 2003). Las mutaciones en heterocigosis, sin embargo, son más comunes y comprenden la mayoría de casos. Éstas a su vez van a dividirse según generen o bien un fenómeno de haploinsuficiencia o bien un efecto dominante negativo (EDN). Se trata de haploinsuficiencia cuando la mutación resulta en la pérdida de función únicamente del alelo afectado, mientras que el otro alelo del gen (el normal o *wild-type* (WT)) es expresado de manera normal. El EDN, sin embargo, se caracteriza no solo por causar una pérdida de función en el alelo mutado sino que además impacta negativamente sobre las subunidades hERG codificadas por el alelo WT, dando lugar a un fenotipo más agresivo de la enfermedad (Furutani y cols., 1999; Kagan y cols., 2000; Anderson y cols., 2006; Smith y cols., 2016).

En general, se han identificado aproximadamente 500 mutaciones en heterocigosis en *KCNH2* asociadas al SQTL2 (Anderson y cols., 2014). En un estudio realizado por Kapplinger y colaboradores se analizaron 226 mutaciones de pérdida de función en pacientes diagnosticados con SQTL2 y se demostró que la mayoría (62%) pertenecían a variantes con cambio de sentido (*missense*), mientras que el 24% eran mutaciones con desplazamiento del marco de lectura (*frameshift*) y el 14% restante una combinación que incluía mutaciones sin sentido (*nonsense*), inserciones, deleciones, duplicaciones e incluso variantes en secuencias localizadas en sitios de *splicing* alternativo. En cuanto a su localización en las subunidades hERG, dichos autores

demonstraron que el 32% de las mutaciones se situaban en el dominio formador del poro, el 29% en el extremo N-terminal (incluyendo un 8% en el dominio PAS) y un 39% en el extremo C-terminal (incluyendo un 8% en el dominio CNBHD) (**Figura II.37**) (Kapplinger y cols., 2009). En el año 2002, Moss y colaboradores demostraron que en aquellos pacientes con SQT2, el riesgo de desarrollar eventos cardíacos era mucho mayor cuando las mutaciones se localizaban en la región formadora del poro de las subunidades hERG, ya que estas variantes eran más propensas a ejercer un EDN que aquellas localizadas en los extremos N- y C-terminales (Moss y cols., 2002). A su vez, observaron que dicho EDN tenía lugar o bien aumentando la tasa de degradación de las subunidades hERG, las cuales quedaban atrapadas en el RE/Golgi (Ficker y cols., 2000), o bien disminuyendo la permeabilidad de los canales a los iones K^+ . En ambos casos el efecto final daba lugar a la inhibición de la I_{Kr} generada por éstos (Moss y cols., 2002).

Por otro lado, las mutaciones de pérdida de función en heterocigosis en el gen *KCNH2* se van a clasificar atendiendo a cuatro criterios: aquellas que afectan a los niveles de expresión del gen (clase 1), aquellas que alteran el tráfico hacia la membrana de las subunidades hERG (clase 2), aquellas que afectan al *gating* de los canales formados (clase 3) y aquellas que afectan a la permeabilidad de los canales a los iones K^+ (clase 4) (Smith y cols., 2016; Bohnen y cols., 2017). La gran mayoría de mutaciones con cambio de sentido asociadas a SQT2 (concretamente el 88%) van a alterar la función de las subunidades hERG por un mecanismo de clase 2 (**Figura II.37**) (Zhou y cols., 1998b; Vandenberg y cols., 2012; Anderson y cols., 2014; Smith y cols., 2016).

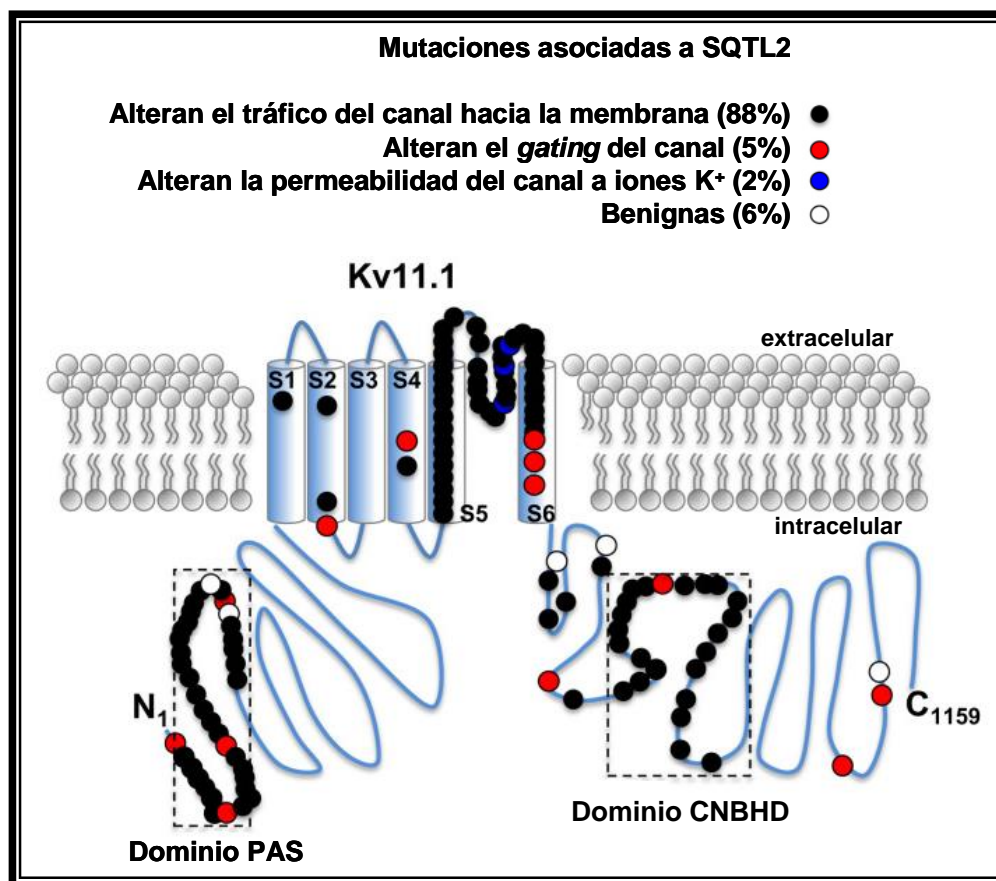


Figura II.37. Tipos de mutaciones con cambio de sentido asociadas a SQTL2 y su localización en los canales hERG. En la imagen se representa una subunidad hERG (1159 aminoácidos) formada por 6 segmentos TM y los dominios N- y C-terminales intracelulares. Aquellas mutaciones que alteran el tráfico, *gating* y permeabilidad al K⁺ de hERG son señaladas con círculos negros, rojos y azules, respectivamente. Como se puede observar, la mayoría de mutaciones alteran el tráfico hacia la membrana de las subunidades hERG y se encuentran localizadas en el dominio PAS (extremo N-terminal), en el dominio formador del poro (incluyendo los segmentos S5 y S6 y el lazo P) y en el dominio CNBHD (extremo C-terminal). Tanto el dominio PAS como CNBHD son resaltados en rectángulos con líneas discontinuas. [Adaptada de Smith y cols., 2016]

Las mutaciones que afectan al tráfico de los canales hERG pueden o bien modificar el propio proceso de tráfico hacia la membrana de las subunidades que forman el canal, o bien alterar el proceso inicial de plegamiento que, en condiciones normales, es necesario para dar lugar a la conformación nativa de la proteína (Zhou y cols., 1998b). Este último proceso tiene lugar en el RE y en el Golgi, e incluye una etapa de maduración a través de la glicosilación de la proteína. De esta manera, aquellas subunidades hERG maduras con un correcto plegamiento y glicosilación (peso molecular de 155 kDa) podrán traficar más fácilmente hacia la membrana plasmática que aquellas subunidades parcialmente glicosiladas (peso molecular de 135 kDa) que no trafican correctamente. Estas diferencias en el peso molecular van a ayudarnos a distinguir cual de los dos mecanismos se encuentra involucrado según el tipo de mutación. Así, en un estudio realizado por Zhou y colaboradores, se identificaron dos variantes en el gen *KCNH2* codificando las subunidades hERG mutantes Y611H y V822M, ambas con un peso de 135 kDa. Esto les ayudó a confirmar que ambos

mutantes cursaron con alteraciones en el tráfico debido a defectos en el plegamiento. De hecho, los autores demostraron que ambos mutantes eran retenidos en el RE y posteriormente ubiquitinados y dregadados vía proteosoma (Zhou y cols., 1998b).

Por otro lado, también existe la posibilidad de que una misma mutación en las subunidades hERG esté asociada a un fenotipo de pérdida de función por una combinación de múltiples mecanismos. Por ejemplo, Kanters y colaboradores identificaron un mutante, hERG F29L, en una familia con SQT2, el cual alteraba el tráfico hacia la membrana de los canales hERG pero también desplazaba la dependencia de voltaje de la inactivación hacia potenciales positivos y aceleraba la cinética de deactivación (Kanters y cols., 2015).

También puede suceder que diferentes mutaciones en un mismo aminoácido den lugar a fenotipos distintos. Por ejemplo, ha sido demostrado que el mutante hERG G626A trafica de manera correcta a la membrana pero posee una alteración en el filtro de selectividad para el K^+ . Ahora bien, si sustituimos dicha mutación por G626D, G626V o G626S, el fenotipo del canal cambia y pasaría a clasificarse como mutante deficiente en tráfico (Anderson y cols., 2014).

3.3.1. Tratamiento del SQT2

El tratamiento para el SQT2 es el mismo que el utilizado para otros tipos de SQT siendo la terapia más común la administración de β -bloqueantes. Además aquellos pacientes de alto riesgo pueden ser sometidos a cirugía del tipo DSCI y/o implantación de un DAI (Sanguinetti, 2010).

Una característica que hace diferente el tratamiento del SQT2 con respecto al resto, es el desarrollo de pequeñas moléculas que actúan como activadoras de los canales hERG. Estas moléculas podrían tener utilidad no sólo para tratar el SQT2 sino también el SQT asociado a la exposición de fármacos, ya que en ambos casos la activación de los canales daría lugar a un aumento de la I_{Kr} generada por ellos, acelerando el proceso de repolarización y acortando la duración del PA cardíaco (Zhou y cols., 2011; Bohnen y cols., 2017).

Actualmente se han identificado hasta 9 moléculas que podrían funcionar como activadoras de canales hERG (**Tabla II.15**). De éstas, 8 han sido sintetizadas de manera química y sólo una (mallotoxina) es de origen natural (Zhou y cols., 2011). Todas ellas son clasificadas a su vez en dos tipos en función del mecanismo de acción (Giacomini y cols., 2015; Bohnen y cols., 2017). Así, aquellas moléculas activadoras de tipo 1, como RPR260243, ejercen su función retrasando la cinética de deactivación de los canales hERG de una manera dependiente de voltaje y de temperatura (Kang y cols., 2005; Perry y cols., 2010) mientras que las de tipo 2 (PD118057, ICA105574, NS1643, entre otras) actúan retrasando la cinética de inactivación y/o desplazando la

dependencia de voltaje de la inactivación hacia voltajes positivos (Casis y cols., 2006; Hansen y cols., 2006; Perry y cols., 2009; Gerlach y cols., 2010; Grunnet y cols., 2011). Aunque en menor medida, algunas de las moléculas incluidas en este último tipo también son capaces de modificar la cinética de deactivación y la dependencia de voltaje de la activación de los canales hERG así como producir un aumento en la probabilidad de apertura de éstos (**Tabla II.15**).

Otras moléculas, como la mallotoxina (extracto natural del árbol *Mallotus philippensis*) o el KB130015 (derivado de la amiodarona), no pueden clasificarse en ninguno de los dos grupos ya que ambas ejercen su acción desplazando la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales más negativos, sin afectar a la deactivación ni a la inactivación de los canales hERG (Zeng y cols., 2006; Gessner y cols., 2010). Por otro lado, algunos compuestos como el A935142 actúan por un mecanismo que reúne las características de activadores tanto de tipo 1 como de tipo 2 (**Tabla II.15**) (Su y cols., 2009).

Actualmente, no se conoce con precisión el sitio de unión de estas moléculas a los canales hERG, a pesar de que la mayoría de estudios apuntan al dominio del poro del canal (segmentos S5 y S6 y lazo P) como la principal región implicada en la interacción (Perry y cols., 2009; Perry y cols., 2010; Bohnen y cols., 2017).

Por último cabe destacar que, a pesar de los recientes avances en el área, ninguno de estos compuestos ha sido evaluado aún en ensayos clínicos para determinar su eficacia y seguridad como tratamiento del SQT (Kang y cols., 2005; Zhou y cols., 2011; Giacomini y cols., 2015).

Nombre del compuesto	Estructura	Mecanismo de acción
RPR260243		Retrasa cinética de deactivación
PD-118057		Atenúa la inactivación
PD-307243		Retrasa la cinética de inactivación y deactivación
NS1643		Atenúa la inactivación
NS3623		Atenúa la inactivación
A-935142		Acelera la cinética de activación, atenúa la inactivación y retrasa la cinética de deactivación
ICA-10557		Principalmente atenúa o inhibe la inactivación
KB130015		Acelera la cinética de activación
Mallotoxina		Desplaza la curva de activación hacia potenciales más negativos

Tabla II.15. Tipos de moléculas activadoras de los canales hERG. En la tabla se puede observar el nombre de cada molécula, su estructura y el mecanismo de acción que llevan a cabo para activar los canales. Mientras que las primeras 8 moléculas son de origen sintético, la mallotoxina tiene su origen a partir del extracto natural del árbol *Mallotus philippensis*. [Adaptada de Zhou y cols., 2011]

4. FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Tbx20

4.1. Características principales de la familia de factores T-box

La proteína Tbx20 se trata de un factor de transcripción incluido dentro de la familia de proteínas conocidas como T-box, implicadas en la regulación de la expresión génica durante la organogénesis y el desarrollo embrionario (Showell y cols., 2004). Concretamente, estos factores van a caracterizarse por actuar en combinación y/o de manera jerárquica regulando varias etapas en el embrión como la formación temprana del mesodermo (Suzuki y cols., 2004), el crecimiento de las diferentes extremidades (Messenger y cols., 2005) o incluso el desarrollo de órganos como el corazón (Plageman y Yutzey, 2005).

En el humano, los genes *T-box* (o genes *TBX*) van a codificar más de 20 factores de transcripción los cuales presentan homología con otros genes presentes en organismos menos evolucionados como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, moscas del género *Drosophila*, el pez cebra o el ratón. De hecho, es en este último modelo donde Herrmann y colaboradores, en el año 1990, clonaron y caracterizaron por primera vez un gen *T-box* codificando un factor al que denominaron factor T o Brachyury, a partir de la presencia de diversas mutaciones que producían en el ratón un fenotipo caracterizado por el desarrollo de colas más cortas (Herrmann y cols., 1990). Desde entonces, numerosos miembros adicionales han sido identificados en organismos tanto vertebrados como invertebrados (Papaioannou, 2001; Plageman y Yutzey, 2005).

El nombre de la familia viene dado gracias a la presencia en todos los miembros de una región, el dominio T-box, implicado en la unión a secuencias específicas de ADN. Este dominio está compuesto por aproximadamente 180 aminoácidos y se encuentra altamente conservado entre las diferentes especies (Plageman y Yutzey, 2005; Stennard y Harvey, 2005; Macindoe y cols., 2009). Además de la unión al ADN, el dominio T-box va a favorecer la interacción entre estas proteínas con otros factores de transcripción que también participan en la embriogénesis.

La familia de genes *T-box* se divide en 5 subfamilias (Tbx1 a Tbx5) gracias al análisis filogenético realizado en base a la similitud de secuencias y estructuras presentes a lo largo de la evolución (Papaioannou, 2001; Naiche y cols., 2005; Plageman y Yutzey, 2005). De todas ellas, las subfamilias Tbx1 y Tbx2 van a estar formadas por los 7 genes principales expresados en el corazón de humanos y otros modelos vertebrados y que son Tbx1-5, Tbx18 y Tbx20 (**Figura II.38**).

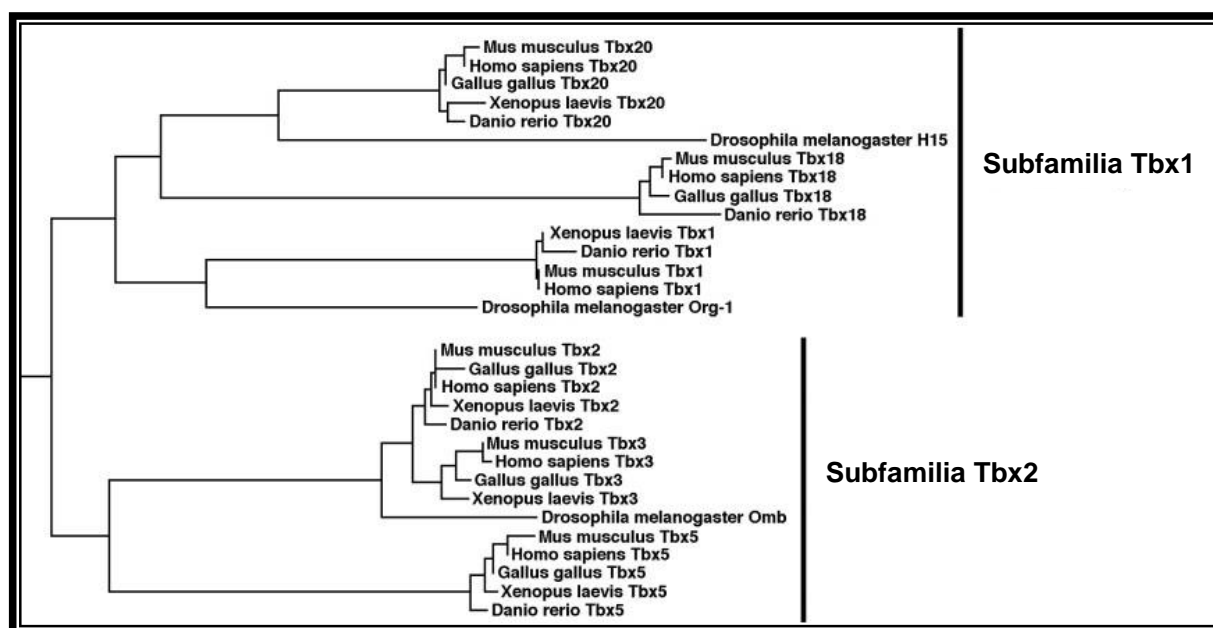


Figura II.38. Árbol filogenético con los genes T-box incluidos dentro de las subfamilias Tbx1 y Tbx2. Los nombres científicos de *Mus musculus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Gallus gallus* y *Homo sapiens* se refieren a las especies ratón común, rana de uñas africanas, pez cebra, gallo y humano, respectivamente. [Adaptada de Plageman y Yutzey, 2005]

Estos 7 genes juegan un papel muy importante durante el desarrollo cardíaco en los diferentes organismos, participando en procesos fundamentales como la diferenciación de células progenitoras hacia los diferentes linajes celulares cardíacos, formación de las cámaras y del sistema valvular, desarrollo del tejido endocárdico y epicárdico y especialización del sistema de conducción (Plageman y Yutzey, 2005; Stennard y Harvey, 2005; Greulich y cols., 2011). De hecho, diversas mutaciones en estos genes han sido asociadas con enfermedades congénitas que cursan con malformaciones y anomalías cardíacas, como por ejemplo el Síndrome de Holt–Oram, asociado a mutaciones en el gen *TBX5* (Basson y cols., 1997; Li y cols., 1997), el Síndrome de DiGeorge (también llamado de delección 22q11.2), debido a mutaciones en el gen *TBX1* (Baldini, 2004), o defectos en la septación y en la valvulogénesis y cardiomiopatía asociado con mutaciones en el gen *TBX20* (Kirk y cols., 2007).

4.2. Interacción entre el ADN y los factores T-box

Originalmente, el sitio específico en el ADN para la unión de los factores T-box fue determinado en el ratón a partir del factor T o Brachyury. En este modelo, se identificó una secuencia consenso parcialmente palindrómica de 20 pb a la que se denominó como sitio-T y referida como 5'-T(G/C)ACACCTAGGTGTGAAATT-3' (Kispert y Herrmann, 1993). Sin embargo, gracias a la obtención de la estructura cristalográfica del factor Brachyury, se demostró



1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 278: 1039-1044.

1

Las proteínas T-box, y más concretamente aquellas que regulan la expresión génica durante la cardiogénesis, pueden actuar como activadores transcripcionales (efecto pro-transcripcional), represores, o ambos, dependiendo del contexto celular (Naiche y cols., 2005). Asimismo, el hecho de que cada proteína pueda actuar de un modo u otro va a depender de las secuencias que forman las regiones flanqueantes al propio dominio T-box (Macindoe y cols., 2009). La expresión conjunta de factores activadores y represores de la transcripción en un mismo compartimento cardíaco podría ser un indicio de la co-existencia de mecanismos tanto cooperativos como competitivos en la regulación de la expresión génica. Por otro lado, la presencia de un dominio tanto activador como represor en el mismo factor, podría indicarnos que dicha proteína regula funciones diferentes dependiendo del contexto molecular y del desarrollo (Plageman y Yutzey, 2005).

4.3. Características principales de Tbx20

El factor de transcripción Tbx20, con un peso molecular de aproximadamente 23,7 kDa (Macindoe y cols., 2009), es un miembro antiguo de la familia T-box incluido dentro de la subfamilia Tbx1 (Plageman y Yutzey, 2005; Stennard y Harvey, 2005). Tbx20 juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica durante el proceso de cardiogénesis embrionario en vertebrados (Meins y cols., 2000). Además del corazón, Tbx20 participa en el desarrollo de otros órganos en el embrión como los ojos, la región ventral del tubo neural y las diferentes extremidades (Meins y cols., 2000).

En etapas tempranas del desarrollo, el factor Tbx20 se localiza en los cardiomiocitos que forman el tubo cardíaco primitivo y en las células endoteliales asociadas a las almohadillas endocárdicas. Estas estructuras van a intervenir en la septación de los diferentes compartimentos del corazón y en la formación de las válvulas y el canal auriculoventricular. De hecho, en etapas posteriores del desarrollo Tbx20 juega un papel muy importante en el desarrollo de las cámaras cardíacas, la proliferación de cardiomiocitos y el desarrollo del sistema valvular (Stennard y Harvey, 2005; Takeuchi y cols., 2005; Boogerd y cols., 2018). Sin embargo, la expresión de Tbx20 no solo se encuentra restringida a la etapa embrionaria, sino que varios estudios han demostrado que su expresión también es fundamental para una correcta homeostasis cardíaca en la etapa adulta de diversos organismos como el ratón o las moscas del género *Drosophila* (Stennard y cols., 2005; Qian y cols., 2008; Shen y cols., 2011; Xiang y cols., 2016). En este último caso no se habla del gen *TBX20* sino de sus correspondientes ortólogos, los genes *neuromancer 1* (*nmr1*) y *2* (*nmr2*), codificando los factores *H15* y *midline*, respectivamente (Miskolczi-McCallum y cols., 2005).

En el año 2003, Stennard y colaboradores demostraron la existencia, en el corazón de ratón, de 3 isoformas diferentes de Tbx20 (Tbx20a, b, c) resultado del splicing alternativo a partir de la expresión del mismo gen *tbx20*. Tbx20a correspondería con la isoforma completa del factor, formada por una secuencia de 446 aminoácidos dividida en un dominio central T-box flanqueado por dominios N- y C-terminales de 102 y 158 aminoácidos, respectivamente. Por el contrario, Tbx20b y c son isoformas más cortas, constituidas por aproximadamente 300 aminoácidos, que han perdido el dominio C-terminal al poseer un codón de terminación prematura de la traducción justo después del final del dominio T-box. Las isoformas Tbx20a y Tbx20b son coexpresadas tanto en el desarrollo cardíaco como en las aurículas y ventrículos del corazón adulto. Sin embargo, los niveles del transcrito que codifica Tbx20a son más abundantes que los de Tbx20b (**Figura II.40**) (Stennard y cols., 2003).

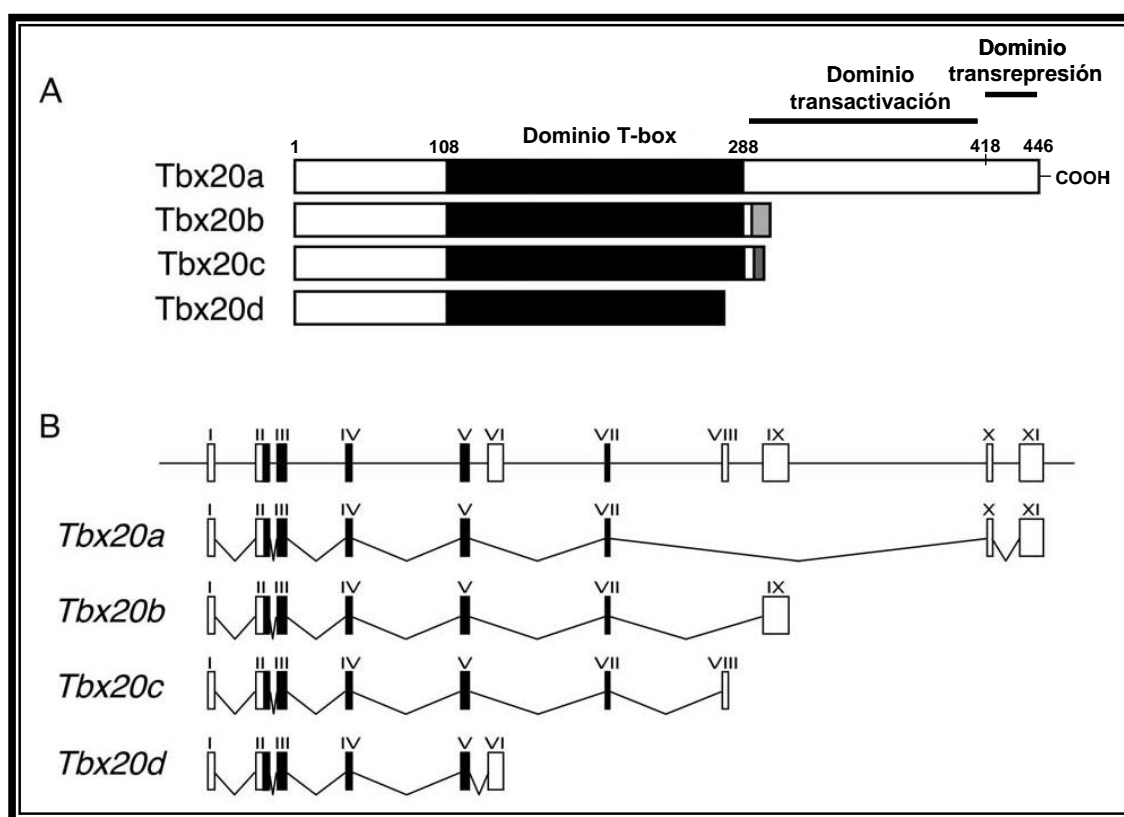


Figura II.40. Estructura y expresión de las diferentes isoformas de Tbx20 (a,b,c y d) en el corazón embrionario de ratón. (A) Representación esquemática de la estructura proteica de las cuatro isoformas de Tbx20. La isoforma Tbx20a es la única que presenta una estructura completa, incluyendo el dominio N-terminal (aminoácidos 1 al 108), el dominio T-box de interacción con el ADN (109 a 287) y las regiones de transactivación y transrepresión en el dominio C-terminal (288 a 446). (B) Representación esquemática de la estructura genómica (intrones y exones) de las cuatro variantes obtenidas por *splicing alternativo* a partir del gen de ratón *Tbx20* (parte superior del panel). Cada variante codifica para cada una de las isoformas de la proteína. Los exones son mostrados como rectángulos numerados, y aquellos que codifican el dominio T-box se muestran rellenos en negro. [Adaptada de Stennard y cols., 2003]

En este mismo estudio, Stennard y colaboradores identificaron una cuarta isoforma adicional, Tbx20d, constituida por 281 aminoácidos. Este factor, al igual que las isoformas b y c, pierde el

dominio C-terminal pero, a diferencia del resto, también va a perder un fragmento del dominio T-box que hace que dicho factor no pueda unirse a las diferentes secuencias consenso del ADN. De hecho, este fragmento, compuesto por el péptido NPFAK, está altamente conservado y predicho por estar envuelto directamente en la unión de los diferentes factores T-box a los sitios T/2 de los promotores en los genes diana (Muller y Herrmann, 1997).

En cuanto a la localización celular, cabe destacar que, a pesar de que la mayoría de factores de transcripción (como Tbx5 o Nkx2-5) están caracterizados por encontrarse únicamente en el núcleo de la célula, en el caso de Tbx20 se ha demostrado que está localizado fundamentalmente en dicho compartimento pero también existen niveles significantes en el citoplasma (Stennard y cols., 2003). De hecho, Debeneditis y colaboradores han demostrado que la isoforma Tbx20b es capaz de interaccionar a través del dominio T-box con la proteína musquelina (Mkln1), encargada de participar en la maquinaria de transducción de señales para el correcto plegamiento y transporte de proteínas nucleocitoplásmicas, en el citoplasma de las células que forman el corazón primitivo de embriones de ratón. Este grupo ha sugerido que el complejo formado entre ambas proteínas se encuentra implicado en la septación y el desarrollo del canal auriculoventricular así como la formación del sistema valvular (Debeneditis y cols., 2011).

La localización celular de los factores de transcripción va a estar regulada principalmente por señales de localización nuclear (SLN) y/o señales de exportación desde el núcleo hacia el citoplasma (SEN), así como por la presencia de diversas proteínas que favorecen el transporte de los factores entre los diferentes compartimentos (Lei y Silver, 2002). Tanto la SLN como la SEN son secuencias específicas de aminoácidos que se encuentran formando parte de los dominios de cada uno de los factores. Tbx20 posee una SLN en el dominio N-terminal (**Figura II.41**). Sin embargo, este factor no parece tener secuencias canónicas SEN (Stennard y cols., 2003), por lo que se requieren estudios más detallados con el fin de conocer cómo dicho factor puede llegar a localizarse en compartimentos extranucleares.

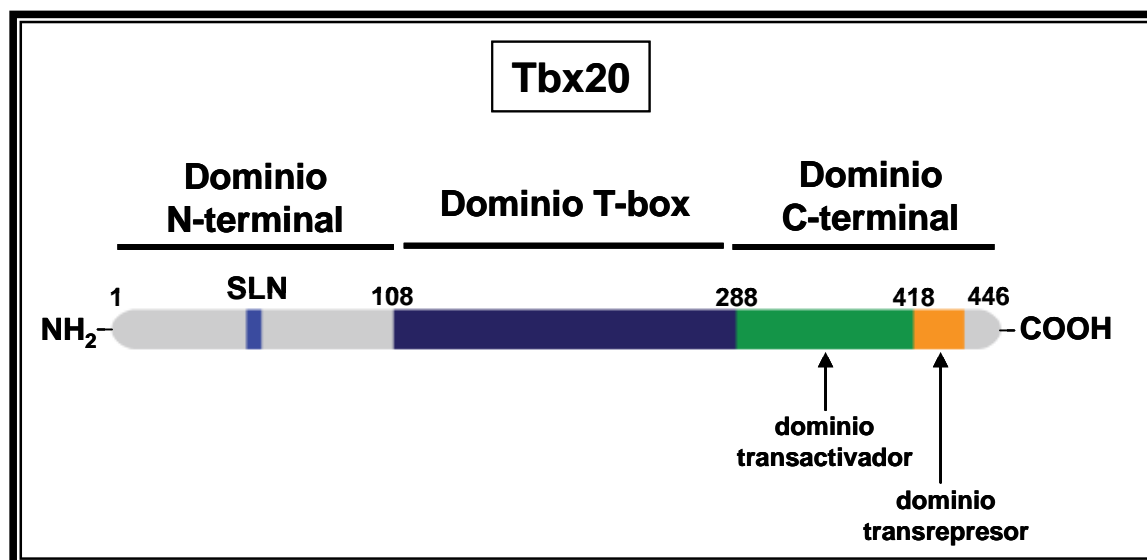


Figura II.41. Representación esquemática del factor de transcripción Tbx20. Las posiciones de los aminoácidos son relativas a la proteína Tbx20 murina. En la imagen se representan los tres dominios principales que componen el factor: el dominio N-terminal (aminoácidos 1 a 108), incluyendo una secuencia de localización nuclear (SLN), el dominio T-box de interacción con el ADN (109 a 287) y el dominio C-terminal (288 a 446) incluyendo el dominio de transactivación y el de transrepresión.

4.4. Interacción entre el ADN y Tbx20

Al igual que el resto de proteínas T-box, Tbx20 posee en su estructura un dominio T-box que le permite unirse a sitios T/2 en el ADN y regular la expresión de los respectivos genes diana. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la afinidad de dicha unión es mucho más débil comparado con la de otros factores como Tbx2 o Tbx5 (Stennard y cols., 2003; Stennard y cols., 2005; Macindoe y cols., 2009). De hecho, este último factor es el que presenta una mayor afinidad por la unión a sitios T/2, con una constante de disociación menor y una cinética de interacción mucho más rápida que las del resto de factores (Macindoe y cols., 2009).

Las diferentes afinidades y cinéticas de interacción que estos factores presentan por su unión al ADN son dependientes de la estabilidad conformacional que presenta el dominio T-box de cada uno de ellos en solución. La estructura secundaria de los dominios T-box de los diferentes factores consiste predominantemente en láminas- β . En el caso de Tbx20, Macindoe y colaboradores mostraron, mediante un estudio de espectropolarimetría de dicroísmo circular, que la composición exacta era de un 34.1% láminas- β , un 6.1% hélices- α y el resto fue asignado como giros- β junto con estructuras aleatorias al azar (*random coils*) (Figura II.42) (Macindoe y cols., 2009). De esta manera, dicho grupo demostró que la estructura plegada del dominio T-box de Tbx20 era mucho menos estable que aquella presente en Tbx5 y Tbx2, siendo la única cuyo núcleo de aminoácidos de carácter hidrofóbico exhibió una estructura de “glóbulo fundido” (estructura parcialmente plegada

en la que sólo aparecen estructuras secundarias y no terciarias) cuando dicha proteína era expuesta a temperaturas de 37°C (Macindoe y cols., 2009). A pesar de ello, Tbx20 es capaz de unirse al ADN ya que los residuos del dominio T-box implicados en la interacción están localizados externamente a dicho núcleo hidrofóbico.

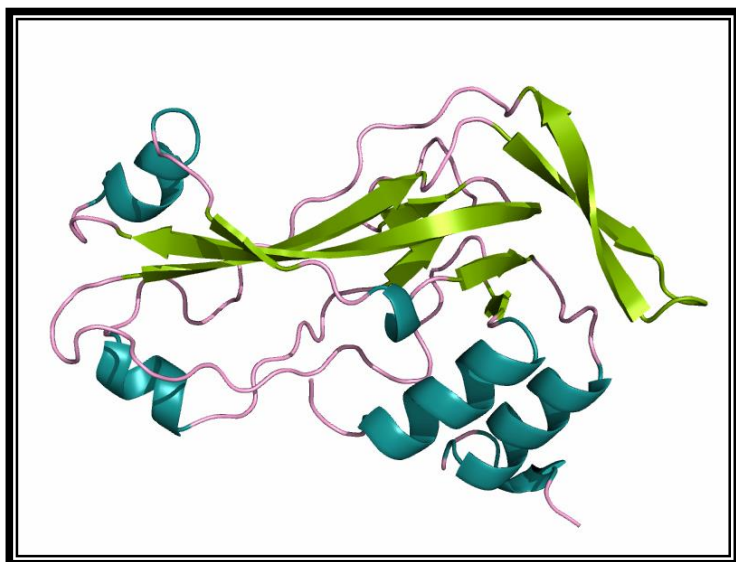


Figura II.42. Estructura secundaria del dominio T-box del factor Tbx20. Dicho dominio está compuesto por un 34.1% láminas- β (verde), 6.1% hélices- α (azul) y el resto consiste en giros- β junto con estructuras aleatorias al azar (rosa). La estructura ha sido obtenida utilizando el programa SWISS-MODEL a partir del modelo propuesto por Macindoe y cols., 2009.

Por otro lado, el modo en el que las diferentes afinidades de los factores afectan a la especificidad por su unión al ADN con el consecuente control diferencial de la expresión génica dependerá de la concentración de cada factor así como de posibles interacciones con otros factores de transcripción de la misma o de diferentes familias. De hecho, la unión de Tbx20 al ADN podría ser estabilizada a partir de la formación de complejos multiproteicos entre éste y otros factores de transcripción o con proteínas modificadoras de histonas (Macindoe y cols., 2009).

Además del dominio T-box, Tbx20 va a poseer un dominio activador (transactivador) y otro represor (transrepresor) de la transcripción de los diferentes genes a los que regula, ambos localizados en la región C-terminal, compuesta por los aminoácidos 288 a 446 (**Figura II.41**) (Stennard y cols., 2003; Plageman y Yutzey, 2005; Sakabe y cols., 2012). Concretamente, ha sido demostrado mediante estudios con diferentes proteínas de fusión que el dominio de transactivación corresponde con los 130 aminoácidos que siguen a la región T-box, mientras que los 28 aminoácidos restantes situados hacia el extremo del dominio C-terminal constituyen el dominio transrepresor (Stennard y cols., 2003).

Mediante diferentes análisis bioinformáticos y de transcriptómica en corazones adultos de ratón, se han identificado varios genes cuya expresión es activada o reprimida por Tbx20. Así, se ha observado que mientras que los genes activados por el factor están fundamentalmente asociados con la función y el desarrollo cardíaco, el sistema circulatorio y el metabolismo energético, aquellos

genes inhibidos por Tbx20 están más bien implicados en controlar la función neuronal, la respuesta inmune, la muerte celular programada (apoptosis) y el desarrollo y proliferación de varios tejidos diferentes al tejido muscular liso o al tejido cardíaco (Sakabe y cols., 2012).

Actualmente no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales Tbx20 es capaz de actuar a la vez como activador y como represor en una misma célula. La teoría más aceptada por la mayoría de autores sugiere que la interacción entre Tbx20 y otras proteínas que actúan como cofactores va a ser la responsable de generar la especificidad transcripcional en dicho factor (Stennard y cols., 2003; Plageman y Yutzey, 2005; Kaltenbrun y cols., 2013). Al igual que sucede con ciertos factores T-box como Tbx2 o Tbx5, Tbx20 va a unirse a las respectivas secuencias de ADN como monómeros (Macindoe y cols., 2009). Esto favorece la heterodimerización de éste con otros factores de transcripción de la misma o de diferentes familias, permitiendo así la formación de complejos encargados de regular la expresión génica.

Diversos estudios han demostrado que Tbx20 es capaz de interactuar físicamente con otros factores de transcripción cardíacos, tales como Tbx5, Nkx2-5, Gata4, Gata5 e Isl1. En todos los casos, la interacción de Tbx20 con estos factores activa la expresión de diversos genes involucrados en el proceso de cardiogénesis a través de un mecanismo sinérgico (Stennard y cols., 2003; Brown y cols., 2005; Takeuchi y cols., 2005). Stennard y colaboradores determinaron que los dominios de cada uno de los factores implicados en la interacción sorprendentemente correspondían con aquellos dominios implicados a su vez en la unión específica de los factores a las secuencias consenso de ADN, y que eran el homeodominio de Nkx2-5, el motivo dedos de zinc (*Z-finger*) del extremo C-terminal de los factores Gata4 y Gata 5 y el correspondiente dominio T-box de Tbx20 (Stennard y cols., 2003; Macindoe y cols., 2009).

En contrapartida, Tbx20 va a asociarse a diferentes proteínas con el fin de reprimir la expresión de diversos genes. Uno de los más conocidos y mejor estudiado es el gen *TBX2* (Singh y cols., 2005; Stennard y Harvey, 2005). El factor Tbx2 es un importante represor de la diferenciación de los cardiomiocitos que formarán las futuras cámaras del corazón en desarrollo. Así pues, Tbx20 se encargará de reprimir la expresión de este factor activando con ello la formación de dichos compartimentos. Diversos estudios han sugerido que el papel supresor de Tbx20 sobre Tbx2 probablemente ocurre a través de un mecanismo que envuelve la participación de la vía de señalización Bmp/Smad (Singh y cols., 2009; Mandel y cols., 2010).

Kaltenbrun y colaboradores demostraron que Tbx20 va a actuar como represor de la transcripción gracias a la asociación con co-represores de la familia TLE/Groucho (TLE1 y TLE3), proteínas asociadas al remodelamiento de la cromatina (helicases de ADN tipo RUVBL1/RUVBL2), miembros del complejo implicado en el remodelamiento del nucleosoma y

deacetilasa (complejo NuRD), incluyendo las proteínas de unión a histonas RBBP4 y RBBP7, la proteína asociada a metástasis tipo 1 (MTA1) y la histona deacetilasa tipo 2 (HDAC2) y, por último, con otras proteínas como la nucleolina, la nucleofosmina o incluso factores T-box con actividad represora como Tbx18 (**Figura II.43**) (Kaltenbrun y cols., 2013). Este mismo grupo demostró que Tbx20 recluta a TLE1 (*Transducin-like Enhancer of Split 1*) y TLE3 (*Transducin-like Enhancer of Split 3*) a través del motivo de unión eh1 (*engrailed homology 1*), presente en el dominio N-terminal del factor y evolutivamente muy conservado. Esta unión previa entre Tbx20 y TLE favorece la posterior unión a los miembros del complejo NuRD.

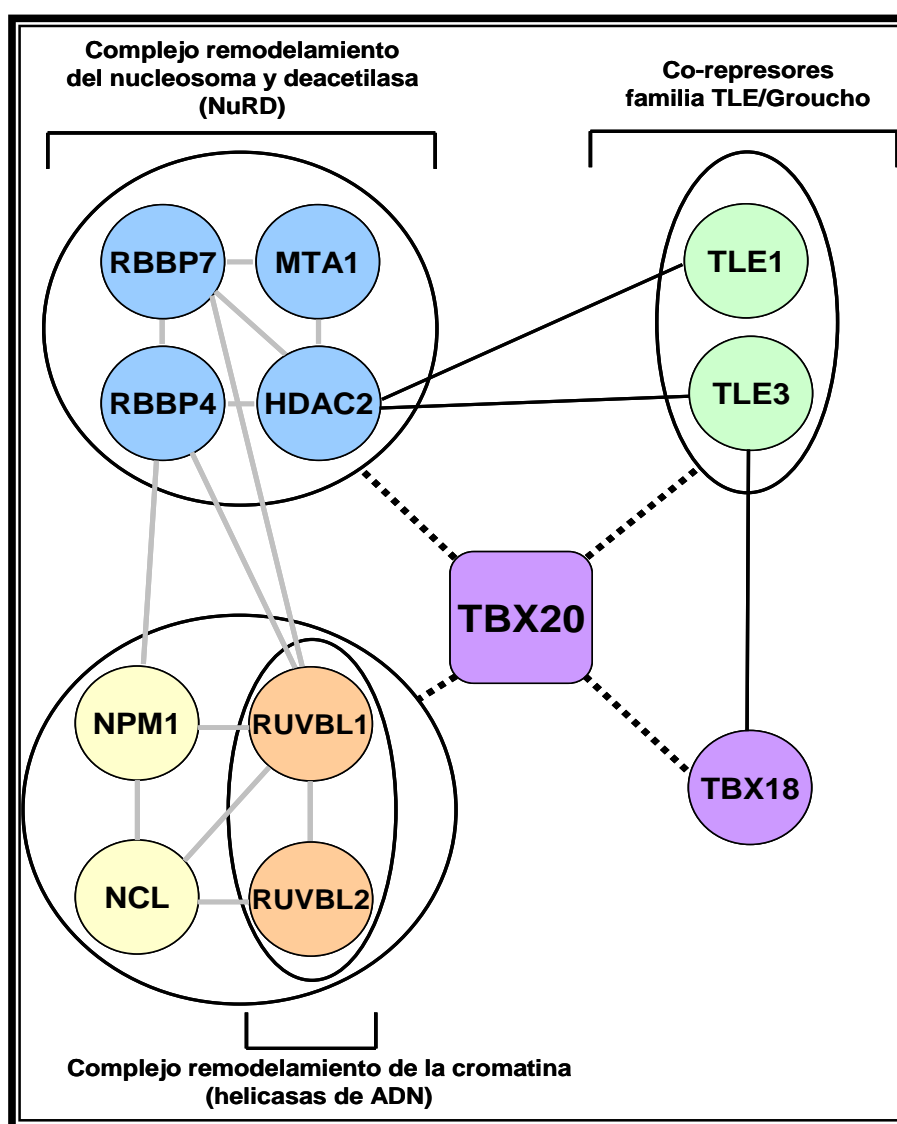


Figura II.43. Interacción entre Tbx20 y diferentes proteínas que favorecen que dicho factor actúe como represor de la transcripción. Algunas de las proteínas se encuentran agrupadas en complejos (círculos o elipses) como son los co-represores de la familia TLE/Groucho, las proteínas asociadas al remodelamiento de la cromatina y los miembros del complejo NuRD. Además, Tbx20 interacciona con la nucleolina, la nucleofosmina o incluso con otros factores T-box con actividad represora como Tbx18. Las líneas discontinuas indican la asociación de Tbx20 con las diferentes proteínas y/o complejos. Las líneas grises indican interacción entre las respectivas proteínas atendiendo a la información recogida con el programa analítico STRING. Las líneas negras continuas indican interacción entre proteínas según la información recogida en la literatura. [Adaptada de Kaltenbrun y cols., 2013]

4.5. Cardiopatías congénitas asociadas a Tbx20

Las cardiopatías congénitas son un grupo de enfermedades de carácter hereditario distinguidas por la presencia de alteraciones estructurales del corazón producidas por defectos en la formación del mismo durante el periodo embrionario. Constituyen el tipo de anomalía cardíaca de nacimiento más prevalente en todo el mundo, apareciendo aproximadamente en el 1% de los recién nacidos vivos, con una incidencia prenatal estimada del 10% (Vecoli y cols., 2014).

Las cardiopatías congénitas han sido clasificadas en más de 20 tipos distintos, incluyendo defectos en el septo interauricular e interventricular, cardiomiopatía dilatada (CMD), ductus arterioso persistente, foramen oval permeable (FOP), tetralogía de Fallot (cardiopatía congénita caracterizada por cuatro malformaciones que dan lugar a la mezcla de sangre arterial con la sangre venosa con efectos cianotizantes) o doble salida del ventrículo derecho, entre otros. Las complicaciones comúnmente asociadas con este tipo de anomalías comprenden un retraso en el desarrollo o daño cerebral, tromboembolismo, hipertensión pulmonar, fallo cardíaco, arritmias e incluso muerte súbita. En los últimos 50 años, los grandes avances en el diagnóstico y tratamiento de las cardiopatías congénitas han permitido que más del 75% de niños afectados por la enfermedad sobrevivan hasta la etapa adulta. Sin embargo, existe un inconveniente, y es que estos avances han traído consigo un aumento en la prevalencia de pacientes adultos que viven con una cardiopatía congénita y que por tanto tienen un riesgo mayor de sufrir complicaciones y MSC (Ntiloudi y cols., 2016).

Las cardiopatías congénitas son de carácter multifactorial, es decir, tanto factores ambientales como genéticos están implicados en su patogénesis, a pesar de que estos últimos son considerados los principales agentes causantes. De hecho, actualmente existen más de 60 genes relacionados con cardiopatías, la mayoría codificando factores de transcripción cardíacos con motivos de unión al ADN tipo homeodominios, motivos de dedos de zinc o dominios T-box (Andersen y cols., 2014). Dentro de éstos, nos encontramos el factor Tbx20, del cual se ha demostrado su implicación en el desarrollo de varios tipos de cardiopatías congénitas (Kirk y cols., 2007; Mittal y cols., 2016; Ghosh y cols., 2017; Huang y cols., 2017).

Originalmente diversos estudios en embriones de ratón mostraron que la aparición de mutaciones en homocigosis en el gen *Tbx20* daba lugar a la muerte del animal durante la fase media de gestación, debido al desarrollo de malformaciones e hipoplasia del tubo cardíaco primitivo. Por el contrario, aquellos ratones con mutaciones en heterocigosis en el mismo gen lograban sobrevivir pero igualmente desarrollaban cardiopatías como alteraciones en el septo interauricular, CMD, hipoplasia del ventrículo derecho y tronco arterioso persistente (Stennard y cols., 2005; Takeuchi y

cols., 2005; Boogerd y cols., 2018). De manera adicional, estudios en otros modelos como el pez cebra o ranas del género *Xenopus* también han demostrado que diversas mutaciones de pérdida o de ganancia de función en *Tbx20* dan lugar al desarrollo de diferentes cardiopatías durante el desarrollo (Cai y cols., 2005).

En el humano, el primer nexo entre mutaciones identificadas en el gen *TBX20* y el desarrollo de cardiopatía congénita fue establecido en el año 2007 por Kirk y colaboradores. Concretamente, dicho grupo reveló la existencia de dos mutaciones de pérdida de función en heterozigosis en el gen *TBX20* en dos pacientes que presentaron defectos en el septo interauricular, CMD y alteraciones en el sistema valvular (Kirk y cols., 2007). A partir de aquí, numerosos estudios han identificado diversas mutaciones en heterozigosis en el gen *TBX20* asociadas con anomalías en el septo interauricular e interventricular, FOP, drenaje venoso pulmonar anómalo total (DVPAT), tetralogía de Fallot, anomalías de la válvula mitral, defectos del septo auriculoventricular, pentalogía de Fallot (tetralogía de Fallot a la que se le añaden defectos del septo interauricular) y CMD (Liu y cols., 2008; Qian y cols., 2008; Posch y cols., 2010; Mittal y cols., 2016; Ghosh y cols., 2017; Huang y cols., 2017).

III. Hipótesis y Objetivos

El síndrome de QT largo (SQTL) es un síndrome arritmogénico primario (SAP) que comprende un grupo de trastornos de la repolarización cardíaca caracterizados por una prolongación excesiva y heterogénea de la duración del potencial de acción (PA) lo que se manifiesta en el electrocardiograma como una prolongación del intervalo QT. Por lo general, presenta un patrón de herencia autosómica dominante y sus manifestaciones clínicas ocurren en niños y adultos jóvenes con corazones estructuralmente normales. El SQTL se asocia al desarrollo de arritmias ventriculares que pueden progresar a una forma de taquicardia ventricular polimórfica (TV) conocida como *torsade de pointes* (TdP) y desencadenar fibrilación ventricular. La aparición de TdP puede producir síncope, si la arritmia es auto-limitada en el tiempo, o dar lugar a convulsiones e incluso muerte súbita cardíaca (MSC) cuando degenera en fibrilación ventricular.

El SQTL se caracteriza por una gran heterogeneidad genética habiéndose identificado hasta 17 genes diferentes asociados a otros tantos tipos de SQTL. Si bien estos síndromes cursan con el mismo fenotipo (prolongación del intervalo QT y aumento en la dispersión de la repolarización ventricular que facilitan la aparición de pospotenciales tempranos y de TdP), presentan una fisiopatología, curso clínico, pronóstico y tratamiento distintos. Además, entre los portadores de una misma mutación la expresividad fenotípica es variable, lo que complica aún más el diagnóstico y pronóstico de los afectados. Esta variabilidad puede explicarse tanto por diferencias demográficas (el sexo o la edad del individuo), como por la existencia de diferentes factores genéticos adicionales.

La repolarización de los PAs es debida a la salida de K^+ a través de distintos tipos de canales de K. Sin embargo, durante la fase 2 del PA también se produce la entrada de Na^+ y de Ca^{2+} , lo que tiende a mantener despolarizado el potencial de membrana durante la meseta del PA. Por tanto, electrofisiológicamente hablando la prolongación de la DPA puede ser consecuencia o bien de una disminución de las corrientes repolarizantes de K^+ o de un aumento de las despolarizantes de Na^+ y Ca^{2+} . Hasta la fecha, los distintos tipos de SQTL se asocian a mutaciones en los genes que codifican las subunidades que forman los canales que generan alguna de las corrientes implicadas o en proteínas que los regulan y/o que interaccionan con ellos en la membrana.

En colaboración con la Unidad de Arritmias del Hospital la Paz y en el contexto del consorcio ITACA (*Investigación Traslacional de Arritmias Cardiacas hereditArias*) se identificó a un varón (caso índice) perteneciente a una familia española de origen africano que había sufrido un síncope y había sido diagnosticado de SQTL. Cuatro mujeres de la familia habían sufrido MSC, dos de las cuales fallecieron siendo muy jóvenes. La variabilidad en la penetrancia y expresividad del SQTL en dicha familia hacía suponer que los condicionantes genéticos subyacentes eran muy complejos.

Por tanto, el **OBJETIVO PRINCIPAL** de la presente **TESIS DOCTORAL** es analizar funcionalmente la o las mutaciones de las que eran portadores el caso índice y los familiares afectados, así como identificar el mecanismo electrofisiológico celular responsable del SQTL de la familia.

Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** de la presente **TESIS DOCTORAL** son:

- 1) Genotipar mediante métodos de secuenciación masiva al caso índice y a los familiares afectados para identificar las variantes genéticas de las que son portadores y que pudieran ser responsables del SQTL.
- 2) Analizar funcionalmente todas las mutaciones identificadas que hipotéticamente se asocien al SQTL. Para ello se realizarán experimentos electrofisiológicos registrando mediante la técnica del *patch-clamp* las corrientes iónicas implicadas en la repolarización ventricular humana en sistemas heterólogos de transfección, células inmortales de origen auricular murino (células HL-1), y cardiomiocitos humanos derivados de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC-CMs). Más aún, se analizará la expresión de las proteínas que forman los canales que generan las corrientes iónicas en los cardiomiocitos humanos, se desarrollarán modelos matemáticos de los PAs, y se registrarán los PAs en los hiPSC-CMs.

IV. Material y Métodos

1. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES

El probando y sus familiares fueron evaluados en la Unidad de Arritmias del Hospital Universitario La Paz. A todos ellos se les realizó un examen clínico completo que incluía ECG, ecocardiograma transtorácico y prueba de esfuerzo. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital Universitario La Paz y se mantuvo en concordancia con los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Asimismo, y previo al estudio, cada participante firmó un consentimiento informado donde se detallaron los fines de todas las pruebas realizadas y/o muestras de sangre extraídas.

1.1. Preparación de las muestras

El ADN genómico fue extraído de las muestras de sangre total utilizando el Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN fue analizado cualitativa- y cuantitativamente mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 y un fluorómetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente la empresa NIMGenetics se encargó de generar librerías de ADN siguiendo el protocolo de enriquecimiento HaloPlex HS a partir de 3 µg de ADN genómico de cada uno de los sujetos participantes. De manera resumida, dicho protocolo consistió en: a) la digestión del ADN de partida con una mezcla determinada de enzimas de restricción, b) la hibridación de sondas específicas (HaloPlex) cuyos extremos son complementarios a los extremos de la secuencia diana digerida, y c) la formación de ADN circular (Halos) a partir de la inserción de las secuencias diana en amplicones. Las sondas utilizadas incluían secuencias específicas biotiniladas y etiquetas moleculares (*barcodes*) para la posterior purificación e identificación, respectivamente, de los amplicones generados, d) la purificación específica de los Halos basada en la captura de las sondas HaloPlex biotiniladas mediante bolas magnéticas de estreptavidina, e) la reacción de ligación de los Halos que los circulariza por completo y que permite eluirlos de las sondas y de las bolas magnéticas, y f) la cuantificación de las librerías generadas mediante análisis de microfluidos usando el Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies) y la amplificación de éstas mediante PCR utilizando oligonucleótidos universales (GeneTouch 2; Life Technologies). Todo este procedimiento permitió la obtención de librerías que contenían el ADN de cada sujeto del estudio amplificado y etiquetado, listo para su secuenciación.

1.2. Secuenciación de las muestras

Las librerías de ADN fueron secuenciadas utilizando un panel de secuenciación masiva personalizado HaloPlex (216,105 kb) diseñado a partir del programa SureDesign (Agilent Technologies) y en el que se incluyeron las regiones codificantes y los extremos transcritos pero no traducidos (5' y 3' UTRs) de los 82 genes mostrados en la **Tabla IV.1**. La secuenciación fue llevada a cabo por la empresa NIMGenetics empleando un sistema de secuenciación masiva de última generación Ion Torrent PGM™ (Life Technologies). Todas las secuencias leídas fueron alineadas frente a la versión del genoma de referencia humano (hg19 GRCh37) empleando el software TMAP-Ion-Alignment. Además de los genes ya descritos asociados con síndromes arritmogénicos hereditarios primarios, se incluyeron otros que también codificaban (i) proteínas constitutivas de canales iónicos cardiacos, (ii) proteínas que participan en la formación de canalsomas en la membrana de células cardiacas, y (iii) proteínas cuya relación en la modulación de la actividad de canales iónicos ha sido demostrada, mediante estudios funcionales, o sugerida, mediante estudios de asociación del genoma completo (en inglés GWAS o *Genome-Wide Association Study*). Se excluyeron los genes asociados con cardiomiopatías estructurales hereditarias y los relacionados con la aparición de taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica puesto que no se incluyeron en el estudio pacientes con esta enfermedad.

Tabla IV.1. Listado de los 82 genes incluidos en el panel de secuenciación masiva personalizado HaloPlex.

Número	Nombre gen	Nombre proteína (Corriente)	Localización cromosómica
1	<i>ABCC9</i>	SUR2A ($I_{K,ATP}$)	12p12.1
2	<i>ACE</i>	Enzima convertidora de angiotensina II	17q23.3
3	<i>ADRB1</i>	Receptor adrenérgico $\beta 1$	10q24-q26
4	<i>ADRB2</i>	Receptor adrenérgico $\beta 2$	5q31-q32
5	<i>AKAP9</i>	Yotiao (proteína de anclaje) (I_{Ks})	7q21-q22
6	<i>ANK2</i>	Anquirina β (proteína de anclaje) ($I_{Na,K}$, I_{NCX} , I_{Na})	4q25-q27
7	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2 ($I_{Ca,L}$)	12p13.3
8	<i>CACNA1D</i>	Cav1.3	3p14.3
9	<i>CACNA1G</i>	Cav3.1 ($I_{Ca,T}$)	17q22
10	<i>CACNA1H</i>	Cav3.2 ($I_{Ca,T}$)	16p13.3
11	<i>CACNA2D1</i>	Cav $\alpha 2\delta$ ($I_{Ca,L}$)	7q21-q22
12	<i>CACNB2</i>	Cav $\beta 2$ ($I_{Ca,L}$)	10p12
13	<i>CALM1</i>	Calmodulina 1	14q32.11
14	<i>CALM2</i>	Calmodulina 2	2p21
15	<i>CASQ2</i>	Calsequestrina 2	1p13.3-p11
16	<i>Cav3</i>	Caveolina 3 (proteína de anclaje) (I_{Na})	3p25
17	<i>CDKN1A</i>	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A (p21, Cip1)	6p21.1
18	<i>CDKN1C</i>	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1C (p57, Kip2)	11p15.5
19	<i>CHRM2</i>	Receptor muscarínico 2	7q35-q36
20	<i>DLG1</i>	SAP97 (proteína de anclaje)	3q29
21	<i>DPP6</i>	Dipeptidil peptidasa-6 (DPP6) (I_{to})	7q36.2
22	<i>FGF13</i>	Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 13	Xq26.3
23	<i>GATA4</i>	GATA4 (factor de transcripción)	8p23.1-p22
24	<i>GJA1</i>	Conexina 43	6q22-q23
25	<i>GJA5</i>	Conexina 40	1q21.1
26	<i>GPC5</i>	Glipicano-5 (proteoglicano heparán sulfato)	13q32
27	<i>GPD1L</i>	Glicerol-3-fosfato dehidrogenasa 1 (I_{Na})	3p22.3
28	<i>HAND1</i>	<i>Heart and neural crest derivatives expressed 1</i> (factor de transcripción)	5q33
29	<i>HCN1</i>	HCN1 (I_f)	5p12
30	<i>HCN2</i>	HCN2 (I_f)	19p13
31	<i>HCN3</i>	HCN3 (I_f)	1q21.2
32	<i>HCN4</i>	HCN4 (I_f)	15q24.1
33	<i>IRX5</i>	<i>Iroquois homeobox 5</i> (factor de transcripción)	16q12.2
34	<i>KCNA4</i>	Kv1.4 ($I_{to,s}$)	11p14
35	<i>KCNA5</i>	Kv1.5 (I_{Kur})	12p13
36	<i>KCNA7</i>	Kv1.7 ($I_{to,1}$)	19q13.3
37	<i>KCNB1</i>	Kv $\beta 1$	20q13.2
38	<i>KCNB2</i>	Kv $\beta 2$	8q13.2
39	<i>KCND2</i>	Kv4.2 (I_{to})	7q31
40	<i>KCND3</i>	Kv4.3 (I_{to})	1p13.2
41	<i>KCNE1</i>	minK (I_{Ks})	21q22.1-q22.2
42	<i>KCNE1L</i>	KCNE1-like (KCNE5) (I_{Ks})	Xq22.3
43	<i>KCNE2</i>	MiRP1 (I_{Kr})	21q22.1
44	<i>KCNE3</i>	MiRP2 ($I_{to,f}$)	11q13.4
45	<i>KCNE4</i>	MiRP3	2q36.1
46	<i>KCNH2</i>	Kv11.1 (I_{Kr})	7q36.1
47	<i>KCNIP2</i>	KChiP2 (I_{to})	10q24.32
48	<i>KCNJ11</i>	Kir6.2 ($I_{K,ATP}$)	11p15.1
49	<i>KCNJ12</i>	Kir2.2 (I_{K1})	17p11.1
50	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1 (I_{K1})	17q24.3
51	<i>KCNJ3</i>	Kir3.1 ($I_{K,ACh}$)	2q24.1
52	<i>KCNJ4</i>	Kir2.3 (I_{K1})	22q13.1
53	<i>KCNJ5</i>	Kir3.4 ($I_{K,ACh}$)	11q24
54	<i>KCNJ8</i>	Kir6.1 ($I_{K,ATP}$)	12p12.1
55	<i>KCNN3</i>	Canales de potasio de baja conductancia activados por calcio tipo 3 (SK3)	1q21.3

56	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1 (I_{Ks})	11p15.5
57	<i>KCNV1</i>	Kv2.3	8q23.2
58	<i>NCS1</i>	Neuronal calcium sensor 1 (FREQ)	9q34.11
59	<i>NOS1</i>	Óxido nítrico sintasa (neuronal)	12q14-qter
60	<i>NOS1AP</i>	Proteína adaptadora de la óxido nítrico sintasa (CAPON) (I_{Kr})	1q23.3
61	<i>PITX2</i>	PITX2 (factor de transcripción)	4q25
62	<i>PLN</i>	Fosfolambano	6q22.1
63	<i>PRKAG2</i>	Subunidad γ -2 de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK)	7q35-q36
64	<i>PRKCA</i>	Subunidad α de la proteína quinasa C (PKC α)	17q22-q24
65	<i>PRMT3</i>	Histona-arginina N-metiltransferasa tipo 3	11p15.1
66	<i>PRMT5</i>	Histona-arginina N-metiltransferasa tipo 5	14q11.2
67	<i>RANGRF</i>	MOG1 (<i>RAN guanine nucleotide release factor</i>)	17p13
68	<i>SCN10A</i>	Nav1.8 (I_{Na})	3p22.2
69	<i>SCN1B</i>	Nav β 1 (I_{Na})	19q13.12
70	<i>SCN2B</i>	Nav β 2 (I_{Na})	11q22-qter
71	<i>SCN3B</i>	Nav β 3 (I_{Na})	11q24.1
72	<i>SCN4B</i>	Nav β 4 (I_{Na})	11q23.3
73	<i>SCN5A</i>	Nav1.5 (I_{Na})	3p21
74	<i>SCN8A</i>	Nav1.6 (I_{Na})	12q13.1
75	<i>SLMAP</i>	Sarcolemma associated protein	3p21.2-p14.3
76	<i>SNTA1</i>	α 1 sintrofina (I_{Na})	20q11.2
77	<i>STRN</i>	Estriatina (<i>calmodulin binding protein</i>)	2p22.2
78	<i>TBX20</i>	Factor transcripción familia <i>T-box</i> 20 (Tbx20)	7p14.3
79	<i>TBX3</i>	Factor transcripción familia <i>T-box</i> 3 (Tbx3)	12q24.1
80	<i>TBX5</i>	Factor transcripción familia <i>T-box</i> 5 (Tbx5)	12q24.1
81	<i>TRPM4</i>	TRPM4 (Corriente generada por cationes monovalentes)	19q13.3
82	<i>TRDN</i>	Triadina	6q22.31

Tabla IV.1 (Continuación). Listado de los 82 genes incluidos en el panel de secuenciación masiva personalizado HaloPlex.

1.3. Análisis bioinformático de las variantes

Una vez realizada la secuenciación de todas las muestras, la empresa NIMGenetics se encargó de analizar las lecturas obtenidas mediante el sistema integrado Torrent Suite v3.6.2. Posteriormente, identificó y anotó todas las variantes encontradas utilizando el algoritmo Variant Caller y el programa bioinformático PROVEAN (http://provean.jcvi.org/genome_submit.php), respectivamente. Por último, se estimó el efecto funcional de aquellas variaciones clasificadas como patogénicas y que aparecían una sola vez en el set de muestras analizadas, utilizando los sistemas de predicción SIFT y MutationTaster, ambos incluidos dentro del paquete de análisis bioinformático ALAMUT (<http://www.interactive-biosoftware.com/>). Todos estos resultados fueron trasladados a nuestro laboratorio donde procedimos a una segunda valoración de las variantes patogénicas de interés atendiendo a diferentes parámetros como la frecuencia alélica (se descartaron todas aquellas variantes con una frecuencia en la población mayor al 1%), consultada en las bases de datos de polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism* ó SNPs) Exome Variant Server (evs.gs.washington.edu/EVS/) y 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org>), la predicción de patogenicidad, utilizando predictores tales como el programa SIFT

(<http://sift.jcvi.org/>) o PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), y la predicción de variantes localizadas en sitios de *splicing*, empleando el paquete de análisis ALAMUT, entre otros. Para consultar mutaciones patogénicas ya descritas se utilizaron las bases de datos Human Gene Mutation (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php) y ExAC Browser (<http://exac.broadinstitute.org/>). En la **Tabla IV.2** se recogen aquellas variantes del probando que fueron consideradas relevantes.

Gen	Genotipo	Alelo Wild-type	Variante	Referencia del SNP	MAF	Frecuencia alélica en la población Africana	Aminoácido sustituido en la proteína	Referencia del transcrito	Predicción de patogenicidad (Provean)	Predicción de Patogenicidad (SIFT)
<i>ACE</i>	Heterocigoto	A	G	rs12709426	0.0050	0.0550	D592G	NM_000789.3	Neutro	Tolerada
<i>ACE</i>	Heterocigoto	T	C	rs4317	0.0180	0.2010	S32P	NM_152830.2	Neutro	Tolerada
<i>ACE</i>	Heterocigoto	A	G	rs4318	0.0190	0.2064	S49G	NM_152830.2	Neutro	Tolerada
<i>ANK2</i>	Heterocigoto	C	T	rs3733617	0.0900	0.3614	P2835S	NM_001148.4	Neutro	Tolerada
<i>ANK2</i>	Heterocigoto	C	G	rs45570339	0.0008	0.0089	L3621V	NM_001148.4	Neutro	Tolerada
<i>CACNB2</i>	Heterocigoto	G	C	rs149167651	0.0001	0.0012	V158L	NM_201590.2	Neutro	Tolerada
<i>KCNB2</i>	Heterocigoto	A	G	rs16938507	0.0041	0.0470	E657G	NM_004770.2	Neutro	Tolerada
<i>KCND2</i>	Heterocigoto	C	T	rs6975107	0.0097	0.1268	Mutación intrónica	NM_012281.2	Neutro	Patogénica
<i>KCNH2</i>	Heterocigoto	T	TG		0.0002	0.0011	T152HfsX180	NM_000238.3	Desconocida	Desconocida
<i>KCNH2</i>	Heterocigoto	T	C	rs151031345	0.00004	0.0003	Q1068R	NM_000238.3	Deletérea	Patogénica
							5'UTR (-66 pb antes del codón ATG)			
<i>KCNN3</i>	Heterocigoto	A	G	rs76040784	0.0120	0.1485		NM_002249.5	Neutro	Patogénica
<i>TBX20</i>	Heterocigoto	G	A	rs199774220	0.0002	0.0001	R311C	NM_001077653.2	Deletérea	Patogénica

Tabla IV.2. Variantes genéticas relevantes identificadas en el probando. MAF (*Minor Allele Frequency*) = frecuencia del alelo menos común en cada uno de los locus genéticos. Los valores de dicha frecuencia, junto con las diferentes frecuencias alélicas en la población Africana y el código de referencia de cada SNP fueron obtenidos a partir de la base de datos ExAC Browser (<http://exac.broadinstitute.org/>). La referencia NM de cada transcrito fue obtenida a partir de la base de datos RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>).

1.4. Secuenciación mediante el método de Sanger

Las variantes identificadas en los genes *KCNH2*, *TBX20* y *KCNN3* fueron confirmadas mediante secuenciación por el método de Sanger (Núñez y cols., 2013; Dolz-Gaitón y cols., 2013; Nieto-Marín y cols., 2019). Para ello, se procedimos a la purificación del ADN genómico del probando y sus familiares a partir de las muestras de sangre total empleando el Kit descrito en el apartado 1.1, así como la respectiva amplificación por PCR de aquellas regiones incluyendo las mutaciones de cada uno de los genes. Los oligonucleótidos cebadores utilizados en cada caso se describen en la **Tabla IV.3**. Los productos amplificados fueron posteriormente purificados utilizando el sistema Illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) y sometidos a secuenciación directa empleando el secuenciador Applied Biosystems ABI Prism 3730 DNA (Secugen). Los resultados fueron comparados con la secuencia de referencia del genoma humano (hg19 GRCh37) utilizando el software Chromas Lite (chromas.software.informer.com/2.4/).

Nombre Gen	Referencia transcrito	Nombre Proteína	Mutación ADNc	Mutación proteína	Secuencia Forward (5'-3')	Secuencia Reverse (5'-3')
KCNH2	NM_000238.3	hERG (Kv 11.1)	c.3203A>G	p.Q1068R	CCCTTCTCCATTCCCTAgCC	ACCTgAgAAAgCgAgTCCAA
KCNH2	NM_000238.3	hERG (Kv 11.1)	c.453dupC	p.T152HfsX180	gCTTTCTgCTCTgCCCAGTg	TCACTTCCCACCTCCAAAgg
TBX20	NM_001077653.2	Tbx20	c.931C>T	p.R311C	gggCTCTCCCTTCCCAAggAg	gggATTgTCCTTgTCCTAgTCAgTC
KCNN3	NM_001204087.1	SK3	c.-66A>G	-----	ACCCCTCTCTTCTTCTCAA	ATCCCCAgAggATggACAg

Tabla IV.3. Genes amplificados por PCR y oligonucleótidos cebadores utilizados. En la tabla se detallan las diferentes mutaciones encontradas en cada gen, así como los oligonucleótidos cebadores directos (*forward*) y reversos (*reverse*) utilizados para la amplificación de las regiones incluyendo cada una de las mutaciones. La referencia de cada transcrito NM se obtuvo a partir de la base de datos RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>).

2. TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE EN PARCHE DE MEMBRANA (*PATCH-CLAMP*)

La técnica de fijación de voltaje comenzó a utilizarse en los años 80 para el registro de corrientes iónicas en células aisladas y permite controlar el potencial de parte o de toda la membrana de la célula (E_m) y registrar la corriente generada a través de los canales iónicos localizados en la membrana al modificar el potencial de la membrana aplicando, p. ej. pulsos hiper o despolarizantes o bien cambios progresivos en el potencial (rampas) (Hamill y cols., 1981). Esta técnica se basa en la formación de un sello de alta resistencia (un “gigasello” de $\approx 2 \text{ G}\Omega$) entre la luz de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula (**Figura IV.1**). La micropipeta se llena con una solución iónica (“solución interna”) cuya composición varía en función de la corriente objeto de estudio. A través de la micropipeta, se inyecta la corriente necesaria para fijar el E_m al valor deseado y, al mismo tiempo, se registra la corriente generada tras la aplicación de pulsos hiper o despolarizantes (Hamill y cols., 1981). La técnica de fijación de voltaje presenta diferentes configuraciones (**Figura IV.2**):

- Configuración de parche sobre célula entera, *cell-attached* u *on-cell patch*.
- Configuración de célula entera o *whole-cell patch*.
- Configuración de parche interior-fuera o *inside-out patch*.
- Configuración de parche exterior-fuera o *outside-out patch*.



Figura IV.1. Formación de un sello de alta resistencia. Se muestran una micropipeta de vidrio y una célula CHO en el transcurso de la formación de un sello de alta resistencia o “gigasello”.

Una vez que se ha puesto en contacto la micropipeta con la superficie de la membrana celular, se aplica una ligera succión, con lo que la porción de la membrana incluida en la luz de la micropipeta se invagina y se forma el sello de alta resistencia. Ésta es la configuración de “parche de membrana sobre célula entera” (*cell-attached* u *on-cell patch*) que permite el registro de la corriente iónica unitaria o microscópica (*i*), generada por la activación de un único canal (*single channel*) presente en el parche de membrana. Esta configuración presenta la ventaja de ser la más fisiológica de las cuatro mencionadas porque no modifica el medio intracelular y es la más adecuada para estudios que requieran la participación de todos los sistemas celulares moduladores del canal iónico. Su principal desventaja es que no permite determinar el potencial de reposo (un indicador de la situación fisiológica de la célula) ya que los valores a los que se fija son relativos al E_m de la célula. Este problema se minimiza perfundiendo las células con una solución externa despolarizante que mantiene el E_m en 0 mV.

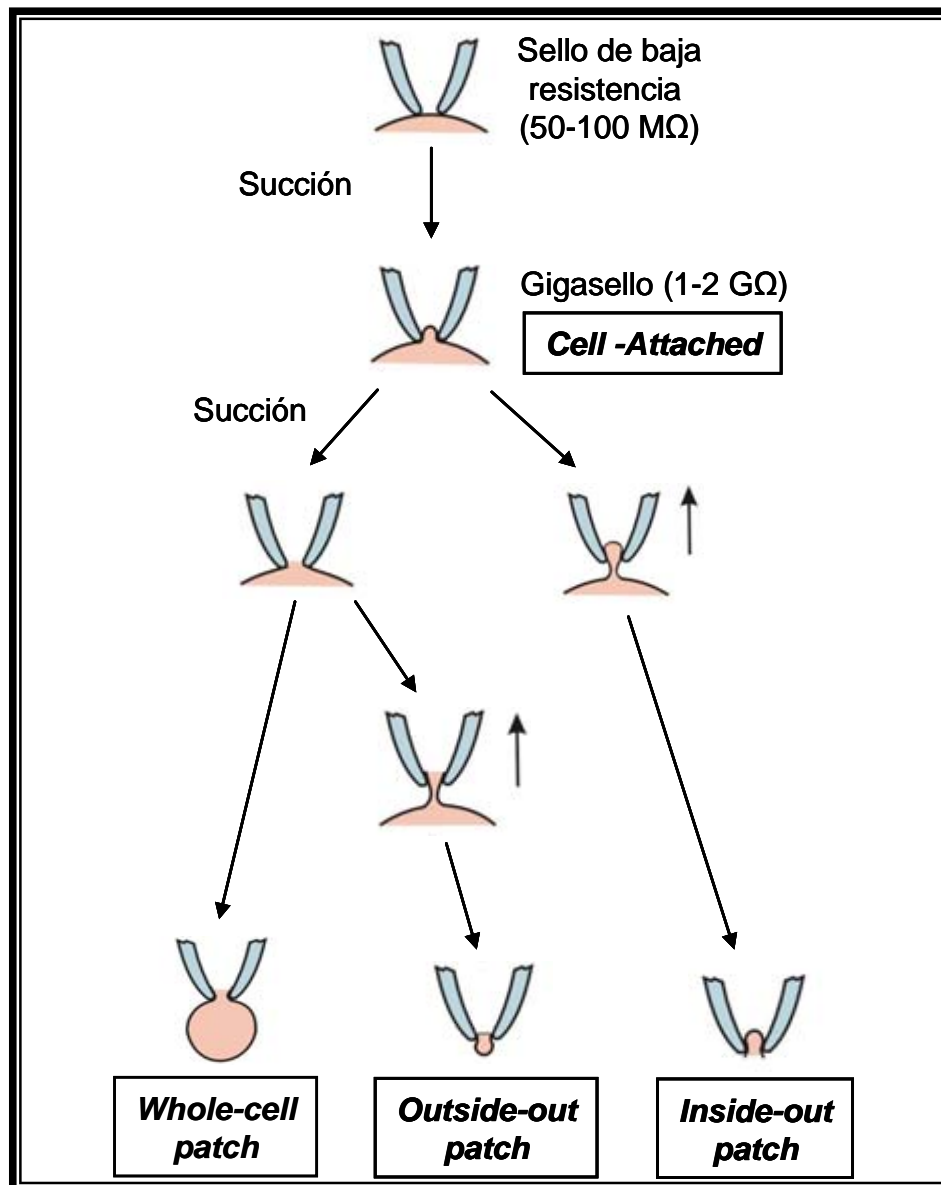


Figura IV.2. Configuraciones de la técnica de *patch-clamp*. Diagrama que ilustra la metodología para conseguir las diferentes configuraciones de los sellos mediante la técnica de *patch-clamp*.

A partir de la configuración de parche de membrana sobre célula entera, y aplicando una ligera succión adicional, se puede romper la porción de membrana invaginada en la luz de la micropipeta y conseguir la configuración de “célula entera” (*whole-cell patch*). Tras la ruptura del parche de membrana, la solución que rellena la micropipeta (solución interna) entra en contacto con el medio intracelular y, al ser mucho mayor su volumen en comparación con el de éste, se produce un recambio casi inmediato, es decir, se produce una diálisis intracelular. En estas condiciones es posible fijar el E_m al valor deseado y, tras la aplicación de los protocolos experimentales adecuados, registrar la corriente iónica resultante de la actividad de todos los canales presentes en la membrana celular o corriente macroscópica (I). Esta configuración permite controlar y modificar a voluntad el medio intracelular, pero también diluye los mediadores intracelulares responsables de la regulación

de los canales iónicos. Para minimizar este problema, la solución interna de la micropipeta se complementa con ATP y otros mediadores (p. ej. fosfocreatina, PIP_2 , etc). Otra posibilidad para minimizar la dilución de los mediadores celulares es utilizar la configuración de “parche de membrana perforado”. Para ello, se añade a la solución interna un antibiótico antifúngico (nistatina o anfotericina B) que, una vez que se ha formado el sello de alta resistencia, va formando pequeños poros en la membrana de la célula, permitiendo así el paso de iones monovalentes. De esta forma, la resistencia de acceso va disminuyendo paulatinamente, mientras que la amplitud de la corriente registrada va aumentando, hasta que ambos parámetros alcanzan valores estables al cabo de ≈ 30 minutos, momento en el que se empieza a registrar la corriente iónica objeto de estudio.

Partiendo de la configuración de parche de membrana sobre célula entera, y elevando la célula del fondo del baño, se puede separar del resto de la célula el parche de membrana incluido en la luz de la micropipeta, quedando así la cara citosólica de la membrana expuesta al medio externo y la extracelular en contacto con la solución interna de la micropipeta. Ésta es la configuración de “parche de membrana interior-fuera” (*inside-out patch*).

Por último, también existe la configuración de “parche de membrana exterior-fuera” (*outside-out patch*), la cual se obtiene a partir de la configuración de célula entera (*whole-cell*). En esta configuración, la cara extracelular de la membrana es la que queda en contacto con la solución externa. Estas dos últimas configuraciones son las también llamadas “de parche escindido” y permiten el registro de corrientes unitarias y macroscópicas en macroparches. Ambas son adecuadas para el estudio del mecanismo de acción de fármacos o mediadores que actúen selectivamente sobre las superficies extra o intracelular de la membrana. Sin embargo, presentan el inconveniente de que desligan los canales iónicos del contenido citosólico que modula su actividad.

Todas las corrientes iónicas descritas en la presente Tesis Doctoral, fueron registradas utilizando la configuración de célula entera (*whole-cell*) de la técnica de *patch-clamp*.

3. OBTENCIÓN DE VECTORES Y MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

El vector de expresión con el ADNc del canal hERG humano fue proporcionado por la Dra. Connie Bezzina, de la Universidad de Amsterdam (Holanda). El ADN fue amplificado por PCR e incorporado al vector pGFPIRS para su expresión en líneas celulares de mamífero (Bezzina y cols., 2003).

Los vectores de expresión (pCMV6-AC-GFP) con el ADNc del canal SK3 humano, con el ADNc del factor de transcripción humano Tbx20 y con el ADNc de la proteína SP1, fueron adquiridos en la empresa OriGene (EEUU) para su expresión en líneas celulares de mamífero.

Los vectores de expresión lentivirales (pLenti-C-mGFP) con el ADNc del factor de transcripción humano Tbx20 (NM_001077653) y con los *shRNAs* específicos para el silenciamiento de Tbx20 de ratón (NM_194263) fueron adquiridos también en la empresa OriGene (EEUU). Estos vectores fueron posteriormente empaquetados en el interior de partículas lentivirales por la Unidad de Vectores Virales del CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares).

Las mutaciones en los genes *TBX20* (c.931C>T) y *KCNH2* (c.453dupC) fueron introducidas en los respectivos plásmidos empleando el kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU) y posteriormente fueron confirmadas mediante secuenciación por el método de Sanger (Secugen) (Dolz-Gaitón y cols., 2013; Matamoros y cols., 2016; Pérez-Hernández y cols., 2018; Nieto-Marín y cols., 2019).

Los vectores con el gen reportero de la luciferasa (pLightSwitch_Prom) precedido por los promotores mínimos de los genes humanos *KCNN3*, tanto su forma WT como mutante (c.-66A>G), *KCNH2*, *KCNQ1*, *KCNE1*, *SCN5A*, *SCN2B* y *CACNA1C* fueron adquiridos en la empresa Active Motif (EEUU).

4. REGISTRO DE LA *I_{hERG}* E *I_{SK3}* EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGOS

Los experimentos presentados en este apartado han sido realizados utilizando como sistema de expresión heterólogo células de ovario de hámster chino (CHO) las cuales representan un buen modelo para el estudio de canales de K⁺, ya que *per se* no generan ninguna corriente de este tipo (Yu y Kerchner., 1998).

4.1. Cultivo y transfección de los canales hERG y SK3 en células CHO

Para el cultivo de las células CHO se emplearon placas de 60 mm de diámetro con medio Ham-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina) (Gómez y cols., 2014; Matamoros y cols., 2016; Pérez-Hernández y cols., 2016; Utrilla y cols., 2017; Pérez-Hernández y cols., 2018; Nieto-Marín y cols., 2019). Todas las líneas celulares se mantenían a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y se pasaban cada 4-5 días mediante un breve tratamiento con tripsina (0.5 mg/mL) (Gómez y cols., 2014;

Matamoros y cols., 2016; Pérez-Hernández y cols., 2016; Utrilla y cols., 2017; Pérez-Hernández y cols., 2018; Nieto-Marin y cols., 2019).

Para el estudio electrofisiológico, las células CHO se transfectaron de forma transitoria con el ADNc que codifica canales hERG (WT y p.T152HfsX180) (0.5 µg o 1µg) o canales SK3 (1.6 µg), junto con el ADNc que codifica el antígeno CD8 de linfocitos humanos incluido en el vector de expresión EBOPcD Leu-2 (0.5 µg). Los experimentos de coexpresión (hERG WT + hERG p.T152HfsX180) se llevaron a cabo usando una relación de 0.5:0.5. La transfección se realizó empleando FuGENE X-tremeGENE (XtremeGENE HP) (Roche Diagnostics, Barcelona, España) el cual fue incubado junto el vector o vectores de expresión que codifican los canales y el antígeno CD8, todo ello en presencia de medio de cultivo Ham-F12 sin suero y sin antibióticos (Gómez y cols., 2014; Matamoros y cols., 2016; Pérez-Hernández y cols., 2016; Utrilla y cols., 2017; Pérez-Hernández y cols., 2018; Nieto-Marin y cols., 2019). La mayor eficiencia de transfección se obtuvo utilizando una relación de 3 volúmenes de X-tremeGENE (en µL) por cada volumen de ADNc (en µg). El reactivo X-tremeGENE está compuesto por una mezcla de componentes catiónicos no liposómicos que propicia que el ADNc se incorpore a las células permitiendo así la expresión en la membrana de los canales objeto de estudio. Tras incubar la mezcla durante 30 minutos, ésta se añadía a las células CHO mantenidas en medio Ham-F12 con suero y con antibióticos. Transcurridas 48 horas, tiempo durante el cual se producía la transcripción del ADNc y la expresión de los canales en la membrana, las células se desprendían de la base de la placa con rascadores de goma, procedimiento mediante el cual la mayoría de las células permanecen intactas. Tras dejar reposar la suspensión celular durante 1 hora a temperatura ambiente, se daba comienzo a los experimentos electrofisiológicos durante las 12 horas siguientes (Gómez y cols., 2014; Matamoros y cols., 2016; Pérez-Hernández y cols., 2016; Utrilla y cols., 2017; Pérez-Hernández y cols., 2018; Nieto-Marin y cols., 2019).

Para seleccionar las células que habían incorporado los vectores, éstas se incubaron con una solución de microesferas de poliestireno unidas a anticuerpos anti-CD8 (DynaBeads M-450; Dynal, Oslo, Noruega). Estos anticuerpos solo se unirán a aquellas células que presentan en su membrana el antígeno CD8 y que, en la mayoría de los casos, presentarán también el canal objeto de estudio (Gómez y cols., 2014; Matamoros y cols., 2016; Pérez-Hernández y cols., 2016; Utrilla y cols., 2017; Pérez-Hernández y cols., 2018; Nieto-Marin y cols., 2019). De este modo, para los experimentos electrofisiológicos, las células transfectadas se identificaron por observación microscópica por la presencia en la membrana de las microesferas de poliestireno (**Figura IV.3**).

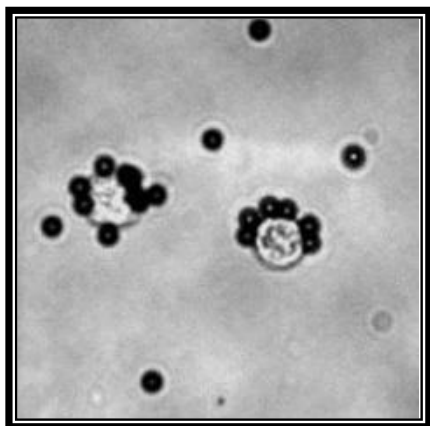


Figura IV.3. Identificación de las células CHO que expresan el antígeno CD8 en su membrana. Células CHO transfectadas con el plásmido EBO-pcD leu2 identificadas mediante anticuerpos anti-CD8 unidos a microesferas de poliestireno (DynaBeads M-450).

4.2. Técnicas de registro en sistemas de expresión heterólogos

Para el registro de I_{hERG} e I_{SK3} en células CHO se colocaba una alícuota de la suspensión de las células transfectadas en una cámara de 0.5 mL montada sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TS100; Nikon Co., Tokio, Japón). Tras asentarse en el fondo de la cámara, las células fueron perfundidas con solución externa (ver composición más adelante) a una velocidad de flujo de ≈ 1 mL/minuto. Las corrientes se registraron a temperatura ambiente. Para la obtención de los registros se utilizó un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). La generación de protocolos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron llevados a cabo mediante el uso del software pCLAMP 9.0 y de sus aplicaciones CLAMPEX y CLAMPFIT (Molecular Devices). Las micropipetas empleadas en los registros fueron obtenidas a partir de capilares de borosilicato de 1.0 y 0.5 mm de diámetro exterior e interior, respectivamente (GD1; Narishige Co. Ltd, Tokio, Japón), utilizando un estirador horizontal de micropipetas programable (P-2000; Sutter Instruments Co., Novato, CA, EEUU). Posteriormente, las puntas de las micropipetas fueron pulidas en una microforja (MF-83; Narishige) hasta alcanzar el diámetro deseado. Para asegurar la calidad de la fijación del voltaje, la resistencia de las micropipetas utilizadas, una vez que se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era inferior a $3.5 \text{ M}\Omega$ para el registro tanto de I_{hERG} como de I_{SK3} . Los artefactos de corriente capacitativa generados al aplicar pulsos simétricos de 10 mV fueron registrados a 50 kHz, filtrados a 10 kHz y posteriormente utilizados para el cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula. Posteriormente se optimizaron la capacitancia y las resistencias en serie; en la mayor parte de los casos se obtuvo una compensación en torno al 80%. La resistencia de acceso no compensada y la capacitancia celular fueron de $1.5 \pm 0.6 \text{ M}\Omega$ y $12.2 \pm 1.0 \text{ pF}$ ($n = 55$ células), respectivamente. En nuestras condiciones experimentales, los errores de voltaje debido a las resistencias en serie fueron mínimos ($<5 \text{ mV}$). Además, la baja capacitancia permitió un rápido control en la fijación de voltaje.

4.3. Registro de la I_{hERG} e I_{SK3} : Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la corriente macroscópica generada por los canales hERG (I_{hERG}) así como la generada por los canales SK3 (I_{SK3}), las células CHO fueron perfundidas con una solución externa que contenía (en mM): NaCl 136, KCl 4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, HEPES 10, y glucosa 10 (ajustada a pH 7.4 con NaOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH₂PO₄ 10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5, y EGTA 5 (ajustada a pH 7.2 con KOH) para el registro de I_{hERG} o KCl 130, MgCl₂ 1.08, HEPES 10, EGTA 10, y CaCl₂ 8.751, alcanzando una concentración libre de calcio (Ca^{2+} no quelado) de 1 μ M (ajustada a pH 7.2 con KOH) para el registro de I_{SK3} (Nagy y cols., 2009; Tuteja y cols., 2010; Adelman y cols., 2012).

El protocolo para el registro de la I_{hERG} consistía en la aplicación de pulsos de 5 s en incrementos de 10 mV entre -80 mV y +60 mV desde un potencial de fijación de -80 mV (Caballero y cols., 2003; Amorós y cols., 2011; Pérez-Hernández y cols., 2016). Las corrientes de cierre fueron obtenidas al repolarizar la membrana a -60 mV durante otros 5 s. Entre -80 y -40 mV sólo se observó corriente lineal inespecífica (“leak”). La corrección de la misma se realizó utilizando un método de mínimos cuadrados con un programa de análisis propio de nuestro laboratorio (Delpón y cols., 1999). Para la construcción de las relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) se representaba la densidad de la corriente (pA/pF) en función del potencial del pulso aplicado. La densidad de la corriente se obtenía para cada experimento normalizando la amplitud de la corriente (pA) medida al final de cada pulso en función de la capacitancia de la membrana celular (pF) de cada célula.

Para analizar la dependencia de voltaje de la activación, se representaba la densidad de las corrientes de cierre frente al potencial de membrana del pulso previo. La amplitud de las corrientes de cierre se medía como la diferencia entre el pico y la corriente al final del pulso. El ajuste de una función de Boltzmann a los valores experimentales permitía obtener las curvas de activación y calcular el punto medio (V_{hact}) y la pendiente (k_{act}).

El análisis de las cinéticas de activación y deactivación se realizó a partir del ajuste de una función monoexponencial a los trazos de corriente máxima generada a 0 mV y del ajuste de una función biexponencial a los trazos de las corrientes de cierre generados tras aplicar pulsos a +60 mV, respectivamente, obteniéndose así las correspondientes constantes de tiempo.

El registro de la I_{SK3} consistió en la aplicación de un protocolo de pulsos con la morfología de un PA ventricular endocárdico humano (Nagy y cols., 2009; Tuteja y cols., 2010; Adelman y cols., 2012) y un protocolo consistente en una rampa de 500 ms de duración desde -100 mV hasta +50 mV (potencial de fijación -80 mV).

5. REGISTRO DE I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Na} , $I_{Ca,L}$ (I_{Ba}), E_{I_f} EN CÉLULAS HL-1

Las células HL-1 derivan de un linaje tumoral de cardiomiocitos auriculares de ratón (AT-1) que a diferencia de éstos, tienen la capacidad de mantenerse en cultivo de manera indefinida y recuperarse tras el proceso de congelación/descongelación, todo ello manteniendo el fenotipo cardíaco adulto y la actividad contráctil (Claycomb y cols., 1998). Debido a estas propiedades, en este apartado utilizaremos dichas células como modelo para el estudio electrofisiológico de corrientes iónicas cardíacas de interés.

5.1. Cultivo y transfección de las células HL-1

Las células HL-1 fueron cultivadas en placas de 60 mm de diámetro cubiertas con una solución de gelatina/fibronectina al 0.1% y medio Claycomb suplementado con suero fetal bovino al 10%, una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina), L-glutamina 4 mM y noradrenalina 100 µM (diluida en ácido ascórbico). Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad relativa del 95% (Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016).

Para el estudio electrofisiológico, las células HL-1 se transfectaron de forma transitoria con el ADNc que codifica canales hERG WT ó p.T152HfsX180 (0.5 o 0.1 µg) o Tbx20 (WT o p.R311C) (2 µg cada uno) empleando lipofectamina (LipofectAMINE 2000, Invitrogen, USA) (Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016). Este método de transfección consiste en la incubación de una mezcla de lipofectamina junto con el vector de expresión que incluye el ADNc que codifica el canal o factor de transcripción en presencia de medio Opti-MEM sin suero. Tanto la cantidad de reactivo como la de medio son calculadas en función del tamaño de la placa de cultivo. La lipofectamina está compuesta por una mezcla de lípidos que propicia que el ADNc se incorpore a las células. Tras añadir la mezcla a las células, éstas se incubaban de 4 a 6 horas a 37°C y posteriormente se cambiaba el medio a Claycomb suplementado. Transcurridas 48 horas, las células eran sometidas a un tratamiento con tripsina al 1% (a 37°C durante 5 minutos) con el fin de desprender las células de las placas y, tras centrifugar y resuspender éstas en medio nuevo, se procedía a realizar los experimentos electrofisiológicos durante las 12 horas siguientes. Todos los vectores de expresión utilizados codificaban, además de nuestras proteínas de interés, proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP), por lo que la selección de aquellas células que habían sido transfectadas se realizó mediante la visualización de la fluorescencia emitida por dicha proteína utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000S, Nikon).

5.2. Silenciamiento de Tbx20 en células HL-1

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo biológico conservado en la evolución que inhibe específicamente la expresión de genes a nivel post-transcripcional, en respuesta a la presencia de secuencias de ARN de doble hebra conocidas como *dsRNAs* (*double stranded RNA*).

EL ARNi fue caracterizado por primera vez en 1998, cuando Fire y cols, demostraron que la introducción de *dsRNA* en el nematodo *Caenorhabditis elegans* indujo la degradación del ARN mensajero (ARNm) que presentaba una secuencia complementaria a una de las hebras de dicho *dsRNA*, resultando en el silenciamiento del gen correspondiente (Fire y cols., 1998). Estudios posteriores demostraron que este fenómeno de silenciamiento tenía como primer paso la entrada del *dsRNA* en el interior de la célula y su posterior escisión a *siRNAs* (*small interfering RNAs*), que son ARNs pequeños de doble cadena de 22-25 nucleótidos de longitud encargados de silenciar la expresión génica (Hamilton y cols., 1999; Zamore y cols., 2000). Dos años más tarde, y usando la información acerca del ARNi en mamíferos, se desarrollaron dos métodos principales para el silenciamiento de genes: por un lado, se usaron *siRNAs* sintéticos de unos 20-21 nucleótidos que se introducían directamente a la célula mediante la transfección con agentes lipídicos (Elbashir y cols., 2002) y, por otro, *shRNAs* (*short hairpin RNAs*), que son *siRNAs* provenientes de la escisión de una sola hebra de ARN con estructura de horquilla (Yu y cols., 2002). Los *shRNAs* son transcritos a partir de ADNc que se introduce a la célula mediante infección con partículas virales las cuales contienen dicho ADN insertado en un vector de expresión de tipo plasmídico.

Dado que la eficiencia de la transfección en las células HL-1 no suele ser muy elevada, se decidió proceder al silenciamiento de Tbx20 mediante la infección con partículas lentivirales portando dos vectores que expresaban *shRNAs* específicos para Tbx20 de ratón (**Tabla IV.4**). Ha sido ampliamente demostrado que la utilización de vectores adenovirales y/o lentivirales permite obtener una eficiencia en la infección cercana al 90% (Kirshenbaum y cols., 1993; Marian y cols., 1995; Djurovic y cols., 2004; Louch y cols., 2011; Lang y cols., 2015). Como control negativo de silenciamiento se utilizó un lentivirus portando un vector de expresión de un *shRNA* que no presentaba una secuencia complementaria a ningún ARNm endógeno celular (*scrambled*). Todos los vectores codificaban además GFP como control de la infección.

Al realizar experimentos previos de *western blot*, demostramos que Tbx20 se silenció en una proporción mayor al 70% a las 48 horas de la infección. Por tanto, los experimentos electrofisiológicos se llevaron a cabo transcurrido ese mismo tiempo tras la infección.

Proteína	shRNA	Secuencia sentido (5'- 3')
Tbx20	shRNA A TBX20	GCCAATGCCTTCTCCATCGCCGCGCTTAT
	shRNA B TBX20	GGAGTGGATCCTGAGTCCAAGTATATAGT

Tabla IV.4. Secuencia de ADN de los *shRNAs* específicos utilizados en el silenciamiento de Tbx20 en células HL-1.

Para las células HL-1, la multiplicidad de infección (MOI) utilizada fue de 15 y 80 para los *shRNAs* de Tbx20 (A y B) y *scrambled*, respectivamente. Se utilizó el mismo stock lentiviral en todos los experimentos para eliminar variables que afectaran a los resultados. Las células infectadas con las construcciones virales se identificaron mediante la visualización de la fluorescencia emitida por GFP utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000S, Nikon).

5.3. Técnicas de registro en células HL-1

El registro de las corrientes nativas en células HL-1 se realizó de manera similar a como se ha descrito en el apartado 4.2 para el registro de corrientes en sistemas de expresión heterólogos. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Las micropipetas empleadas presentaban una resistencia inferior a 3.5 MΩ. El cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula se realizó como se ha descrito para los sistemas de expresión heterólogos. En las células HL-1 los valores de la resistencia de acceso y de capacitancia celular fueron 1.7 ± 0.8 MΩ y 62.1 ± 8.1 pF ($n = 75$ células), respectivamente. En nuestras condiciones experimentales los errores de voltaje debido a las resistencias en serie fueron mínimos (<5 mV).

5.4. Registro de I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Na} , $I_{Ca,L}$ (I_{Ba}), e I_f en células HL-1: Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la I_{Kr} e I_{Ks} en células HL-1 la solución externa contenía (en mM): NaCl 140, KCl 4, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 10, glucosa 10, y 4-AP 2 (ajustada a pH 7.4 con NaOH) (Barana y cols., 2014., Pérez-Hernández y cols., 2016). A dicha solución se le añadía nifedipino (1 μM) y atropina (0.1 μM) para inhibir la $I_{Ca,L}$ e $I_{K,ACh}$, respectivamente. Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH₂PO₄ 10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5 y EGTA 5 (ajustada a pH 7.2 con KOH). En algunos experimentos, y para confirmar que la corriente registrada era I_{Kr} , se perfundían las células con solución externa a la que se añadía dofetilida (1 μM) como inhibidor selectivo de dicha corriente

(Tamargo y cols., 2004). Mientras que la I_{Ks} se definió como corriente resistente a dofetilida, la I_{Kr} fue descrita como la corriente sensible a dicho fármaco y su amplitud a los diferentes voltajes estudiados se calculó como la diferencia entre la corriente total, registrada con la solución externa carente de dofetilida, y la corriente registrada en presencia de ésta.

Para el registro de la I_{Na} en células HL-1 la solución externa contenía (en mM): NaCl 100, CsCl 50, MgCl₂ 1.5, CaCl₂ 1, HEPES 5, y glucosa 5 (ajustada a pH 7.35 con CsOH) (Matamoros y cols., 2016). A dicha solución se le añadía nifedipino (1 μ M) para inhibir la $I_{Ca,L}$. Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (mM): NaF 10, CsF 110, CsCl 20, HEPES 10, y EGTA 10 (ajustada a pH 7.35 con CsOH). Con el fin de minimizar los cambios en las propiedades tiempo y voltaje dependientes de la corriente I_{Na} , los registros se realizaron 20 minutos después de establecer la configuración de célula entera. En estas condiciones, la amplitud de la corriente y la dependencia de voltaje de la activación e inactivación se mantenían estables durante el transcurso del experimento.

Para registrar la $I_{Ca,L}$ en células HL-1, el Ba²⁺ fue utilizado como portador de cargas (I_{Ba}) (Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016) lo que ralentiza la inactivación de la corriente y aumenta su tamaño y su estabilidad en el tiempo. En estos experimentos, la solución externa contenía (en mM): N-metil-D-glucamina 137, CsCl 12, BaCl₂ 20, MgCl₂ 1, HEPES 10, y glucosa 10 (ajustada a pH 7.4 con HCl). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna que contenía (en mM): CsCl 125, cloruro de tetraetilamonio (TEA·Cl) 20, MgATP 5, fosfocreatina 3.6, HEPES 10, y EGTA 10 (ajustada a pH 7.2 con CsOH).

Para registrar la I_f en células HL-1 la solución externa contenía (en mM): NaCl 120, KCl 20, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 10, 4-AP 2, y glucosa 10 (ajustada a pH 7.4 con NaOH). A dicha solución se le añadía nifedipino (1 μ M), atropina (1 μ M) y glibenclamida (10 μ M) para inhibir la $I_{Ca,L}$, $I_{K,ACh}$ e $I_{K,ATP}$, respectivamente. Además dicha solución fue suplementada con BaCl₂ (100 μ M) para inhibir la I_{K1} . Las micropipetas utilizadas para el registro fueron rellenadas con una solución interna que contenía (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH₂PO₄ 10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5, y EGTA 5 (ajustada a pH 7.2 con KOH).

El protocolo para registrar la I_{Kr} y la corriente resistente a dofetilida (I_{Ks}) consistió en la aplicación de pulsos de 5 s en incrementos de 10 mV entre -80 mV y +60 mV. El potencial de fijación en ambos casos se mantuvo a -80 mV. Las corrientes de cierre fueron obtenidas al repolarizar la membrana a -60 mV para I_{Kr} y a -30 mV para I_{Ks} , durante otros 5 s (Pérez-Hernández y cols., 2016). En todos los experimentos, la amplitud de la corriente (pA) se normalizó a la capacitancia de la membrana celular (pF) para obtener la densidad de corriente (pA/pF). Las

relaciones densidad de corriente-voltaje se obtuvieron, en ambos casos, representando la densidad de la corriente medida al final de cada pulso en función del potencial de membrana del pulso aplicado. Para analizar la dependencia de voltaje de la activación de los canales hERG, se representaba la densidad de las corrientes de cierre, medida como la diferencia entre el pico de corriente y el final del pulso, frente al potencial de membrana del pulso previo. En el caso de la I_{Ks} , dicha dependencia se estudió construyendo las curvas conductancia-voltaje en las que se representaba el valor de la conductancia normalizado en función del potencial de membrana. La conductancia (G) fue calculada mediante la ecuación:

$$G = I_{Ks}/(E_m - E_K) \quad (\text{IV.1})$$

donde G es la conductancia a un potencial de membrana (E_m) dado, I_{Ks} representa la amplitud de la corriente a dicho E_m y E_K es el potencial de inversión (-77 mV) (Sanguinetti y cols., 1996; Pérez-Hernández y cols., 2016).

El ajuste mediante una función de Boltzmann a los datos experimentales, tanto de los canales hERG como Kv7.1, permitió obtener las curvas de activación y calcular los respectivos puntos medios (V_{hact}) y pendientes (k_{act}) de cada curva.

El análisis del curso temporal de la activación de los canales hERG y Kv7.1 se realizó ajustando en ambos casos los trazos de corriente máxima a una función monoexponencial. Por otro lado, el análisis del curso temporal de la deactivación de dichos canales se realizó ajustando los trazos de las corrientes de cierre generadas tras aplicar pulsos a +60 mV a una función bi- y monoexponencial, respectivamente. Este procedimiento permitió obtener las constantes de tiempo (τ) de activación y deactivación para cada uno de los correspondientes casos.

El protocolo para registrar la I_{Na} consistió en la aplicación de pulsos de 20 ms en incrementos de 5 mV entre -90 mV y +30 mV, desde un potencial de fijación de -120 mV. En todos los experimentos, la amplitud de la corriente (pA) se normalizó a la capacitancia de la membrana celular (pF) para obtener la densidad de corriente (pA/pF). Las relaciones densidad de corriente-voltaje se obtuvieron representando la densidad de la corriente medida como la diferencia de amplitud entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial de membrana del pulso aplicado. Para determinar el E_{Na} (potencial de inversión para el Na^+) las relaciones densidad de corriente-voltaje fueron ajustadas a la ecuación:

$$I_{Na} = (E_m - E_{Na}) * G_{max} * (1 + \exp[(E_m - V_h)/k])^{-1} \quad (\text{IV.2})$$

donde I_{Na} es el pico de corriente en cada pulso al potencial deseado E_m , G_{max} la conductancia máxima, V_h es el punto medio de la curva y k el valor de la pendiente.

La dependencia de voltaje de la activación de los canales Nav1.5 se analizó construyendo las curvas conductancia–voltaje (curvas de activación). Para cada experimento, la curva de activación se obtuvo representando el valor de la conductancia normalizado en función del potencial de membrana. La conductancia (G) fue calculada mediante la ecuación:

$$G = I_{Na}/(E_m - E_{Na}) \quad (IV.3)$$

donde G es la conductancia a un E_m dado, I_{Na} representa el pico máximo de corriente al E_m y E_{Na} es el potencial de inversión calculado mediante la **ecuación IV.2**.

Por otro lado, la dependencia de voltaje de la inactivación fue determinada mediante un protocolo de doble pulso en el que primero se aplicaba un pulso de 500 ms de duración desde -130 mV hasta -30 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación -120 mV), seguido de un segundo pulso test a -20 mV. Para cada experimento, la curva de inactivación se obtuvo representando la amplitud de corriente obtenida en el pulso test, normalizada con respecto al pico de corriente máxima, en función del potencial de membrana del pulso previo.

El ajuste de una función de Boltzmann tanto a las curvas de activación como a las de inactivación, permitió obtener los respectivos puntos medios (V_{hact} y V_{hinact}) y pendientes (k_{act} y k_{inact}) de cada curva, respectivamente.

El análisis del curso temporal de la activación e inactivación de los canales Nav1.5 se realizó ajustando los trazos de corriente máxima a una función monoexponencial y biexponencial, respectivamente, obteniendo las correspondientes constantes de tiempo.

Para registrar el componente persistente de la I_{Na} ($I_{Na,L}$), se aplicaron pulsos únicos de 500 ms de duración a -20 mV (potencial de fijación -120 mV). La corriente fue medida como la amplitud generada al final de los pulsos despolarizantes.

El protocolo para el registro de la I_{Ba} consistió en la aplicación de pulsos de 500 ms en incrementos de 10 mV entre -40 mV y +70 mV desde un potencial de fijación de -30 mV (Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016). En todos los experimentos, la amplitud de la corriente (pA) se normalizó a la capacitancia de la membrana celular (pF) para obtener la densidad de corriente (pA/pF). Las relaciones densidad de corriente-voltaje se obtuvieron representando la densidad de la corriente medida como la diferencia de amplitud entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial de membrana del pulso aplicado. Para determinar el E_{Ba} (potencial de inversión para el Ba^{2+}) las relaciones densidad de corriente-voltaje fueron ajustadas a la ecuación:

$$I_{Ba} = (E_m - E_{Ba}) * G_{max} * (1 + \exp[E_m - V_h]/k)^{-1} \quad (IV.4)$$

donde I_{Ba} es el pico de corriente en cada pulso al potencial deseado E_m , G_{max} la conductancia máxima, V_h es el punto medio de la curva y k el valor de la pendiente.

La dependencia de voltaje de la activación se estudió construyendo las curvas conductancia – voltaje (curvas de activación). Cada curva de activación se obtuvo representando el valor de la conductancia normalizado en función del potencial de membrana. La conductancia (G) fue calculada mediante la ecuación:

$$G = I_{Ba}/(E_m - E_{Ba}) \quad (IV.5)$$

donde G es la conductancia a un E_m dado, I_{Ba} representa el pico máximo de corriente al E_m y E_{Ba} es el potencial de inversión calculado mediante la **ecuación IV.4**.

Por otro lado, la dependencia de voltaje de la inactivación fue determinada mediante un protocolo de doble pulso en el que primero se aplicaba un pulso de 500 ms de duración desde -50 mV hasta +20 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación -30 mV), seguido de un segundo pulso test a +20 mV. Las curvas de inactivación se construyeron representando la amplitud de corriente obtenida en el pulso test, normalizada con respecto al pico de corriente máxima, en función del potencial de membrana del pulso previo.

El ajuste de una función de Boltzmann tanto a las curvas de activación como a las de inactivación, permitió obtener los respectivos puntos medios (V_{hact} y V_{hinact}) y pendientes (k_{act} y k_{inact}) de cada curva, respectivamente.

El análisis del curso temporal de la activación e inactivación de los canales Cav1.2 se realizó ajustando los trazos de corriente máxima a una función monoexponencial y biexponencial, respectivamente, obteniendo las correspondientes constantes de tiempo.

El protocolo para registrar la I_f consistió en la aplicación de pulsos de 2s en incrementos de 10 mV entre -150 mV y 0 mV desde un potencial de fijación de -30 mV. En todos los experimentos, la amplitud de la corriente (pA) se normalizó a la capacitancia de la membrana celular (pF) para obtener la densidad de corriente (pA/pF). Las relaciones densidad de corriente-voltaje se obtuvieron representando la densidad de la corriente medida al final de cada pulso en función del voltaje aplicado.

6. REGISTRO DE I_{K1} EN MIOCITOS VENTRICULARES DE RATA ADULTA

6.1. Disociación enzimática de miocitos ventriculares de rata

El manejo de los animales de experimentación se realizó de conformidad con lo especificado en la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo sobre la protección de animales utilizados con propósitos científicos y ha sido aprobado por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad Complutense de Madrid.

Los miocitos ventriculares se aislaron a partir de corazones de tres ratas macho adultas de la raza Sprague-Dawley (con pesos de entre 225 y 250 gramos) mediante disociación enzimática siguiendo un protocolo utilizado por nuestro grupo (Matamoros y cols., 2016; Pérez-Hernández y cols., 2018). Las ratas fueron heparinizadas (1000 U/kg i.p.) y anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Una vez anestesiadas se procedía a una toracotomía y a la extracción del corazón que se conectó rápidamente a un sistema de perfusión de Langendorff a través de una cánula insertada en la aorta. El corazón se perfundió inicialmente con una solución *Tyrode* 0 Ca^{2+} (cuya composición era en mM: NaCl 112, KCl 10, MgCl_2 1.2, HEPES 10, taurina 20, y glucosa 10; ajustado a pH 7.4 con NaOH) durante 10 minutos con un flujo constante de 8 mL/minuto. A continuación, el corazón se perfundió durante otros 15 minutos con la misma solución suplementada con 0.35 mg/mL colagenasa tipo II (Worthington) y albúmina al 1%. Las soluciones perfundidas estaban continuamente oxigenadas (95% O_2 /5% CO_2) y con una temperatura estable a 37°C. Una vez realizada la perfusión, los corazones se descolgaron del aparato de Langendorff y los ventrículos se cortaron en pequeños trozos y se mantuvieron en agitación suave con una solución *Tyrode* suplementada con 1 mM CaCl_2 , 33 μM blebistatina y 2% de albúmina, para dispersar las células. Las células obtenidas se dejaron reposar durante 30 minutos y se resuspendieron en Medio 199 (M199, Sigma) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Invitrogen, USA), 1.8 mM Ca^{2+} , 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin.

6.2. Cultivo e infección de miocitos ventriculares de rata

Debido a la baja eficiencia (10%) en la transfección de plásmidos en miocitos con agentes liposolubles tales como FuGENE X-tremeGENE (XtremeGENE HP) o LipofectAMINE 2000, se decidió utilizar construcciones lentivirales para la expresión de las proteínas de interés. Para ello, y una vez que los miocitos ventriculares fueron disociados y resuspendidos en Medio 199, éstos se sembraron en cubre objetos estériles previamente tratados con laminina 0,04 mg/mL (Sigma) y se

mantuvieron en ese mismo medio durante dos horas. Transcurrido este tiempo, los miocitos fueron infectados con las construcciones lentivirales portando vectores específicos para la expresión de Tbx20 humano WT o p.R311C a una MOI de 40 y 70, respectivamente. Todos los vectores codificaban además GFP como control de la infección. Se utilizó el mismo stock lentiviral en todos los experimentos para eliminar variables que afectaran a los resultados. Las corrientes se registraron 48 horas después de la infección. Aquellos miocitos que habían sido infectados se identificaron mediante la visualización de la fluorescencia emitida por GFP utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000S, Nikon).

6.3. Técnicas de registro en miocitos ventriculares de rata

El registro de la I_{K1} nativa en miocitos ventriculares de rata se realizaba de manera similar a como se ha explicado en el apartado 4.2 para el registro de corrientes en sistemas de expresión heterólogos. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente. Las micropipetas empleadas en estos registros fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 4.2 y su resistencia, una vez rellenas con la solución interna y sumergidas en la solución externa, era de 2-4 M Ω . El cálculo de la capacitancia y de la resistencia de acceso a la célula se realizó como se ha descrito previamente para los sistemas de expresión heterólogos. Los valores de la resistencia de acceso y de capacitancia celular en los miocitos fueron de 2.0 ± 0.9 M Ω y 122 ± 6.0 pF ($n=33$), respectivamente. En nuestras condiciones experimentales los errores de voltaje debido a las resistencias en serie fueron mínimos (<5 mV).

Los voltajes se corrigieron según el *Liquid Junction Potential* (LJP) (Neher, 1992; Gómez y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a). El LJP entre la pipeta y la solución externa utilizadas para el registro de la I_{K1} en miocitos ventriculares de rata fue de -12 mV.

6.4. Registro de la I_{K1} ventricular de rata: Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la I_{K1} en miocitos ventriculares de rata, la solución externa contenía (en mM): NaCl 120, KCl 20, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, HEPES 10, 4-AP 2, y glucosa 10 (ajustada a pH 7.4 con NaOH) (Matamoros y cols., 2016; Pérez-Hernández y cols., 2018). A dicha solución se le añadía nifedipino (1 μ M), atropina (1 μ M) y glibenclamida (10 μ M) para inhibir la $I_{Ca,L}$, $I_{K,ACh}$ e $I_{K,ATP}$, respectivamente. Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna que contenía (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH₂PO₄ 10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5, y EGTA 5 (ajustada a pH 7.2 con KOH) (Matamoros y cols., 2016; Pérez-Hernández y cols., 2018).

El protocolo para registrar la I_{K1} consistió en pulsos de 250 ms en incrementos de 10 mV (desde un potencial de fijación de -40 mV) a potenciales entre -100 y +40 mV. En todos los experimentos, la amplitud de la corriente (pA) se normalizó a la capacitancia de la membrana celular (pF) para obtener la densidad de corriente (pA/pF). Las relaciones densidad de corriente-voltaje se obtuvieron representando la densidad de la corriente medida al final del pulso en función del potencial de la membrana.

7. REGISTRO DE I_{Kr} , $I_{Ca,L}$ y PAs EN CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS HUMANAS (hiPSC-CMs)

7.1. Obtención de los cardiomiocitos ventriculares derivados de hiPSC

Estos procedimientos se llevaron a cabo en el Center for Arrhythmia Research de la Universidad de Michigan (EEUU) en el laboratorio del Dr. José Jalife. Los cardiomiocitos (CMs) ventriculares derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas (*human induced pluripotent stem cell* o hiPSC) se obtuvieron a partir de la línea DF19-9-11T que fue originalmente diferenciada a partir de fibroblastos de piel humanos. Para la des-diferenciación de fibroblastos y la obtención de las hiPSC se usaron vectores episomales que no se integran en el genoma (para evitar mutaciones). Tras eliminar el episoma, las hiPSC estaban libres de vectores y de secuencias de transgenes (Yu y cols., 2009). El uso de hiPSC y los cardiomiocitos derivados de ellas (hiPSC-CMs) fue aprobado por el Comité *Human Pluripotent Stem Cell Research Oversight* (HPSCRO) de la Universidad de Michigan (USA).

7.2. Diferenciación, cultivo e infección de hiPSC-CMs

Las hiPSC obtenidas a partir de la línea DF19-9-11T se sembraron sobre membranas estériles transparentes de polidimetilsiloxano (PDMS) previamente recubiertas con Matrigel (500 µg/mL; BD Biosciences, San Jose, CA) para la diferenciación cardíaca dirigida utilizando protocolos previamente descritos (Herron y cols., 2016). El medio para la diferenciación (EB-20) contenía 80% DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)/F12, 0.1 mM β-mercaptoetanol, 20% FBS, y 10 µM blebbistatina (Herron y cols., 2016). El protocolo de diferenciación consistió en la incubación durante 7 días con distintos fármacos (*small molecule protocol*), lo que permitió la diferenciación de hiPSC a cardiomiocitos. Treinta días después del inicio del proceso de diferenciación, las células se

purificaron usando el kit comercial Mitenyi Biotec (*PSC-Derived Cardiomyocyte Isolation Kit, human*). Las hiPSC-CMs resultantes fueron de nuevo cultivadas sobre membranas de PDMS cubiertas con Matrigel (Herron y cols., 2016). Posteriormente las células fueron disociadas cuidadosamente desde los cultivos usando agitación mecánica y, tras ello, se sembraron sobre cubreobjetos de cristal recubiertos con laminina para proceder a su infección con las construcciones lentivirales portando vectores específicos para la expresión de Tbx20 humano WT o mutante a una MOI de 40 y 70, respectivamente. Todos los vectores codificaban además GFP como control de la infección. El mismo stock lentiviral fue utilizado en todos los experimentos para eliminar variables que afectaran a los resultados. Las corrientes iónicas y los PAs se registraron 48 horas después de la infección. Aquellas células infectadas con las construcciones lentivirales fueron identificadas mediante la visualización de la fluorescencia emitida por GFP (Nikon Eclipse TE2000S, Nikon).

7.3. Técnicas de registro en hiPSC-CMs

El registro de las corrientes nativas y PAs en hiPSC-CMs se llevó a cabo colocando el cubreobjetos con las células infectadas en una cámara de 0.5 mL montada sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TS100; Nikon Co., Tokio, Japón). Las corrientes iónicas y los PAs fueron registrados a temperatura ambiente y a 35 °C, respectivamente, utilizando la técnica de *patch-clamp* (de fijación de voltaje para las corrientes iónicas y de fijación de corriente para los PAs) en su configuración de célula entera. Para la obtención de los registros se utilizó un amplificador MultiClamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). La generación de protocolos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron llevados a cabo mediante el uso del software pCLAMP 9.0 y de sus aplicaciones CLAMPEX y CLAMPFIT (Molecular Devices). Las micropipetas empleadas en los registros fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 4.2. Para asegurar la calidad de la fijación del voltaje, la resistencia de las micropipetas utilizadas, una vez que se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era inferior a 3.5 M Ω para el registro de corrientes, o entre 4 y 6 M Ω para el registro de PAs. En todos los experimentos, la resistencia en serie y la capacitancia celular fueron compensadas automáticamente.

7.4. Registro de I_{Kr} , $I_{Ca,L}$ y PAs en hiPSC-CMs: Soluciones y protocolos experimentales

La solución externa empleada para registrar I_{Kr} contenía (en mM): NaCl 140, KCl 5.4, MgCl₂ 1, HEPES 15, 4-AP 5, glucosa 5, CdCl₂ 0.2, BaCl₂ 0.5, y CaCl₂ 1.8 (ajustada a pH 7.4 con NaOH) (Tamargo y cols., 2004; Anson y cols., 2004; Shen y cols., 2011). Las micropipetas utilizadas para el

registro se rellenaron con una solución interna que contenía (en mM): KCl 150, K₂ATP 4.46, fosfocreatina 5, HEPES 5, EGTA 5, MgCl₂ 1, y ácido β-hidroxibutírico 2 (ajustada a pH 7.2 con KOH). Para el registro de la $I_{Ca,L}$ la solución externa contenía (en mM): NaCl 137, CsCl 5.4, MgCl₂ 1.25, HEPES 10, CaCl₂ 1.2, y glucosa 5.5 (ajustada a pH 7.35 con NaOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna que contenía (en mM): CsCl 120, TEA·Cl 20, MgCl₂ 1, Mg-ATP 5.2, HEPES 10, y EGTA 10 (ajustada a pH 7.2 con CsOH).

El protocolo para registrar la I_{Kr} en hiPSC-CMs consistió en pulsos de 3 s en incrementos de 10 mV desde un potencial de fijación de -60 mV a potenciales entre -40 mV y +60 mV. Las corrientes de cierre fueron obtenidas al repolarizar la membrana a -60 mV durante otros 5 s (Amorós y cols., 2011; Pérez-Hernández y cols., 2016). La I_{Kr} fue medida como la corriente sensible a dofetilida (1 μM). En todos los experimentos, la amplitud de la corriente (pA) se normalizó a la capacitancia de la membrana celular (pF) para obtener la densidad de corriente (pA/pF). Para analizar la dependencia de voltaje de la activación, se representaba el pico máximo de la densidad de las corrientes de cierre frente al potencial de membrana del pulso previo. El ajuste de una función de Boltzmann a los datos permitió construir las curvas de activación y obtener el punto medio (V_{hact}) y la pendiente (k_{act}) de cada curva. El análisis del curso temporal de la deactivación de los canales hERG se realizó ajustando una función monoexponencial a los trazos de las corrientes de cierre generadas al aplicar un pulso previo de +60 mV, obteniéndose así la correspondiente constante de tiempo.

El protocolo para registrar la $I_{Ca,L}$ en hiPSC-CMs consistió en pulsos de 200 ms en incrementos de 10 mV desde un potencial de fijación de -80 mV a potenciales entre -50 mV y +60 mV (Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016). Se aplicó un prepulso de -50 ms a -30 antes de cada pulso test para activar e inactivar la I_{Na} . En todos los experimentos, la amplitud de la corriente (pA) se normalizó a la capacitancia de la membrana celular (pF) para obtener la densidad de corriente (pA/pF). Las relaciones densidad de corriente-voltaje se obtuvieron representando la densidad de la corriente medida como la diferencia de corriente entre el pico máximo y el final del pulso en función del potencial de membrana del pulso aplicado.

Para el registro de los PAs, la solución externa contenía (en mM): 148 NaCl, NaH₂PO₄ 0.4, MgCl₂ 1, glucosa 5.5, KCl 5.4, HEPES 15, y CaCl₂ 1.8 (ajustada a pH 7.4 con NaOH) (González de la Fuente y cols., 2013; Herron y cols., 2016; Pérez-Hernández y cols., 2018). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna que contenía (en mM): KCl 150, K₂ATP 4.46, fosfocreatina 5, HEPES 5, EGTA 1, MgCl₂ 1, y ácido β-hidroxibutírico 2 (ajustada a pH 7.2 con KOH) (Pérez-Hernández y cols., 2018). Las células fueron estimuladas a 0.1, 0.5, 1 y 2

Hz utilizando pulsos cuadrados de 30-50 pA de 4ms de duración, generados por un simulador digital DS8000 (World Precision Instruments, USA). En todos los casos se analizaron los siguientes parámetros que caracterizan a los PAs cardiacos: potencial de reposo, potencial diastólico máximo (PDM), amplitud del PA (APA), velocidad máxima de despolarización ($V_{\text{máx}}$), y la duración del PA medida al 20%, 50% y 90% de la repolarización (DPA₂₀, DPA₅₀ y DPA₉₀, respectivamente).

8. EXPERIMENTOS DE WESTERN BLOT (WB)

8.1. Extracción proteica en células HL-1 transfectadas y/o infectadas

Las células HL-1 se transfectaron de manera transitoria con el ADNc que codifica Tbx20 WT o p.R311C utilizando el método de transfección con lipofectamina descrito en el apartado 5.1, o bien se infectaron con lentivirus portando *shRNAs* específicos para el silenciamiento de Tbx20 y *shRNA scrambled* control (procedimiento descrito en apartado 5.2). En ambos casos, tras 48 horas de incubación, las células se lavaron con tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline* o PBS) frío (3x) y se lisaron incubándolas con tampón *radioimmunoprecipitation assay* (tampón RIPA) frío, cuya composición era 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato y una mezcla de inhibidores de proteasas P2714 (Sigma), durante 30 minutos a 4°C. Los núcleos y restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se utilizó inmediatamente para evitar ciclos de congelación/descongelación y posible degradación proteica.

8.2. Cuantificación de proteínas

Para cuantificar la cantidad de proteínas totales extraída de cada muestra, se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA, Thermo Scientific, Pierce) siguiendo las instrucciones del proveedor. El BCA es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ion cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret).

El procedimiento consistió, básicamente, en preparar distintas diluciones de las muestras junto con los reactivos A y B del kit y, tras 30 minutos a 37°C, se leyó la absorbancia a 562 nm. Con los datos obtenidos se construyó una curva patrón con las distintas concentraciones conocidas de albúmina bovina (*Bovine Serum Albumin* o BSA) frente a los valores obtenidos de la absorbancia,

que permitió cuantificar la cantidad de proteína presente en las diferentes muestras objeto de estudio mediante extrapolación.

8.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida, transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección

Las muestras se cargaron en geles comerciales TGX *stain free*TM (Bio-Rad, USA) del 10% y se sometieron a electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970) a voltaje de 200 y 300 V. Como patrón de pesos moleculares se utilizó el marcador *Precision Plus Protein Standards All Blue*, 10-250 kDa (Bio-Rad, USA). Una vez finalizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia rápida (Bio-Rad, USA) durante 15 minutos a 25 V del gel a una membrana de nitrocelulosa.

A continuación, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios a la membrana, ésta se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación con PBS suplementado con Tween al 0.05% (PBS-T) y leche desnatada liofilizada al 5% para, seguidamente, incubar con el anticuerpo primario (diluido en tampón de bloqueo) a 4°C y agitación constante durante toda la noche. En el WB para la detección de los canales hERG, uno de los carriles fue incubado aparte con una mezcla a partes iguales del Ac primario más el péptido antigénico. Este péptido se utilizó para bloquear de manera específica los sitios de unión del Ac, de tal manera que éste ahora no pueda unirse a la proteína de interés presente en la membrana, resultando todo ello en ausencia de banda específica en el carril en cuestión. Este procedimiento se utilizó como control con el fin de comprobar que las bandas que aparecían en la membrana fuesen específicas y no correspondiesen a fragmentos inespecíficos de diferentes proteínas.

Al día siguiente, tras lavar la membrana 3 veces durante 7 minutos cada vez con tampón PBS-T, ésta se incubó durante una hora a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (diluido en tampón de bloqueo). Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno en PBS-T y, posteriormente, se procedió a la detección de proteínas en la membrana mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL, General Electric Healthcare, USA). Se utilizó un equipo de imagen Chemidoc MP System y el software Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad, USA) para el análisis densitométrico de las imágenes. Para asegurar la carga equitativa de proteína de las diferentes muestras, la expresión de cada proteína en la membrana de nitrocelulosa fue normalizada a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis, respectivamente.

8.4. Anticuerpos empleados

La detección específica de las proteínas Cav1.2, Kir2.1, Kv7.1, minK, hERG y MiRP1 se llevó a cabo usando como anticuerpos primarios anti-Cav1.2 de ratón (1:1000, clon L57/46, Neuromab, USA), anti-Kir2.1 de conejo (1:500, Alomone, Israel), anti-Kv7.1 de conejo (1:250, Sigma), anti-minK de conejo (1:250, Abcam, Reino Unido), anti-hERG de conejo (solo o junto con péptido antigénico) (1:3000, Alomone), y anti-MiRP1 de conejo (1:600, Sigma), respectivamente. Para los experimentos de silenciamiento, la presencia de Tbx20, tanto en las células control como en aquellas con la proteína silenciada, se detectó específicamente usando el anticuerpo primario anti-Tbx20 de conejo (1:200, Abcam).

El anticuerpo anti-IgG de ratón unido a HRP (1:10000, Jackson ImmunoResearch), y el anticuerpo anti-IgG de conejo unido a HRP (1:10000, Jackson ImmunoResearch) se usaron como anticuerpos secundarios en todos los ensayos.

9. ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA

9.1. Detección de la actividad luciferasa en células HL-1

Para estos ensayos se emplearon células HL-1 sembradas en placas de 96 pocillos con fondo opaco y transfectadas de manera transitoria utilizando el método de transfección con lipofectamina descrito en el apartado 5.1. La transfección se llevó a cabo con el vector de expresión del enzima luciferasa pLightSwitch_Prom (Active Motif) portando los promotores mínimos de los genes humanos *SCN5A*, *SCN2B*, *CACNA1C*, *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNH2* o *KCNN3* (WT o mutado). En estos experimentos las células además fueron cotransfectadas con 100 ng de un vector vacío [Tbx20 (-)], o con los vectores que codificaban Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. Los efectos de la cotransfección de Tbx20 WT y p.R311C (100 ng de cada uno) en aquellas células expresando el vector de expresión de luciferasa junto al promotor del gen *KCNH2* fueron también determinados. En algunos experimentos, el factor de transcripción SP1 se utilizó como control positivo de la transcripción. Pasadas 48 horas tras la transfección, se procedió a la detección de la actividad luciferasa usando el reactivo LightSwitch Luciferase Assay Reagent (Active Motif) y un luminómetro de la marca Berthold (Barana y cols., 2014; Pérez-Hernández y cols., 2016). En todos los casos, los análisis fueron llevados a cabo en pocillos por triplicado y la actividad luciferasa fue normalizada a la actividad luciferasa basal presente en aquellas células control transfectadas con el vector vacío [Tbx20 (-)].

10. MODELO MATEMÁTICO DEL PA VENTRICULAR HUMANO

Con el fin de analizar los efectos producidos por la mutación en heterocigosis de los canales hERG p.T152HfsX180 sola o en combinación con la mutación p.R311C en Tbx20, sobre el potencial de acción humano, se llevó a cabo una simulación *in silico* empleando el modelo matemático Grandi-Bers (Grandi y cols., 2010), el cual representa un potencial de acción ventricular humano previamente validado y utilizado en estudios anteriores con propósitos similares (Amorós y cols., 2011; González de la Fuente y cols., 2013). Los potenciales de acción simulados fueron ejecutados con el programa MATLAB 6.5 (MathWorks) usando el algoritmo de integración ode15s. Los modelos celulares epicárdico y endocárdico fueron ejecutados a diferentes frecuencias en un rango de 0.1 a 3 Hz y durante al menos 200 ciclos de registro hasta conseguir mantener constantes los valores de amplitud de las diferentes corrientes, así como las concentraciones iónicas del medio intra- y extracelular. El modelo fue ejecutado en condiciones basales (control) y, posteriormente, incorporando los cambios específicos en conductancia, constantes de tiempo y dependencia de voltaje de la activación e inactivación producidos por los mutantes hERG p.T152HfsX180 y Tbx20 p.R311C y determinados previamente al realizar los correspondientes análisis electrofisiológicos *in vitro*.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En cada serie homogénea de experimentos se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (EEM). Los datos que aparecen en las distintas tablas y representaciones gráficas de la presente Tesis Doctoral se expresan como la media \pm EEM para un determinado número (n) de experimentos. Para las comparaciones entre diferentes grupos, se empleó la prueba *t* de Student no pareada o el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Newman-Keuls. En muestras de pequeño tamaño ($n < 15$), la significancia estadística fue confirmada utilizando tests no paramétricos. Las comparaciones entre variables categóricas fueron realizadas usando la prueba Z. Para tener en cuenta la evaluación de muestras repetidas, los datos fueron analizados con modelos multinivel de efectos mixtos. Se consideraron como significativas aquellas diferencias para las que el valor de *P* resultó ser menor de 0.05.

Para la realización del análisis estadístico y la composición de las figuras que ilustran esta Tesis Doctoral se emplearon la aplicación CLAMPFIT del paquete informático PCLAMP (v9.0) (Molecular Devices), las aplicaciones Excel y PowerPoint del paquete informático Microsoft Office

2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) y el programa Prism (v3.0 y v4.0) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU).

V. Resultados

Los resultados de la presente Tesis Doctoral se han dividido en seis apartados. En el primero de ellos se describen los antecedentes clínicos tanto del probando como del resto de miembros que integran la familia que presentan un SQT. En un segundo apartado se describen los resultados de los estudios genéticos a los que fueron sometidos el probando y sus familiares. En los cuatro restantes se detallan los resultados de los estudios funcionales de las variantes identificadas en el probando (p.T152HfsX180 en los canales hERG, p.R311C en el factor de transcripción Tbx20 y c.-66A>G en la región promotora del gen *KCNN3*) que, sobre bases teóricas, podían ser responsables del SQT.

En la presente Tesis se demuestra, por primera vez, que el factor de transcripción Tbx20 regula la expresión de canales hERG en el miocardio adulto humano uniéndose al promotor del gen que los codifica (*KCNH2*). El mutante Tbx20 p.R311C carece de actividad pro-transcripcional por lo que produce una disminución significativa en la expresión de dichos canales y de la corriente generada por ellos (I_{Kr}). La disminución de la I_{Kr} es responsable de la prolongación en la duración del PA cardíaco, lo que se traduce en una prolongación del intervalo QT del ECG, que da lugar al desarrollo de SQT.

1. ANTECEDENTES CLÍNICOS

Un paciente varón (probando) de 41 años (**II:4, Figura V.1**) que había sufrido un síncope al levantarse de la cama fue trasladado a la Unidad de Arritmias del Hospital Universitario la Paz de Madrid. El ECG de 12 derivaciones que se le realizó al ingreso demostró que estaba en ritmo sinusal (68 latidos por minuto) y que tanto el intervalo PR (168 ms) como el QRS (88 ms) eran normales. Se observó también una disminución en la amplitud y un aumento en la duración de las ondas T (**Figura V.2, panel A**). De hecho, el intervalo QT corregido mediante la fórmula de Bazett fue de 480 ms (Taran y Szilagyi, 1947; Bazett, 1997), un valor patológicamente alto y más en el caso de un varón. Al realizarle una prueba de esfuerzo y un Holter no se observaron alteraciones significativas. Es de resaltar que el estudio ecocardiográfico demostró que el probando presentaba un corazón estructuralmente normal. Como consecuencia, se le diagnosticó un SQT y se inició un tratamiento con bisoprolol (2.5 mg/día). Desde entonces el paciente no ha sufrido nuevos episodios arrítmicos o síncope. Al analizar sus antecedentes familiares se evidenció que otros parientes presentaban SQT y que algunos de ellos habían sufrido MSC (**Figura V.1**).

Dos de las cinco hermanas del probando habían fallecido de manera repentina, una a los 19 años durante el periodo postparto (**II:2**) y otra a los 17 (**II:5, Figura V.1**). Ambas habían sido diagnosticadas de epilepsia y tratadas con fenobarbital hasta su defunción. Sin embargo, a la

hermana **II:2** se le había realizado un ECG en el que el intervalo QTc fue de 440 ms, un valor normal para una mujer y un test de adrenalina que resultó negativo.

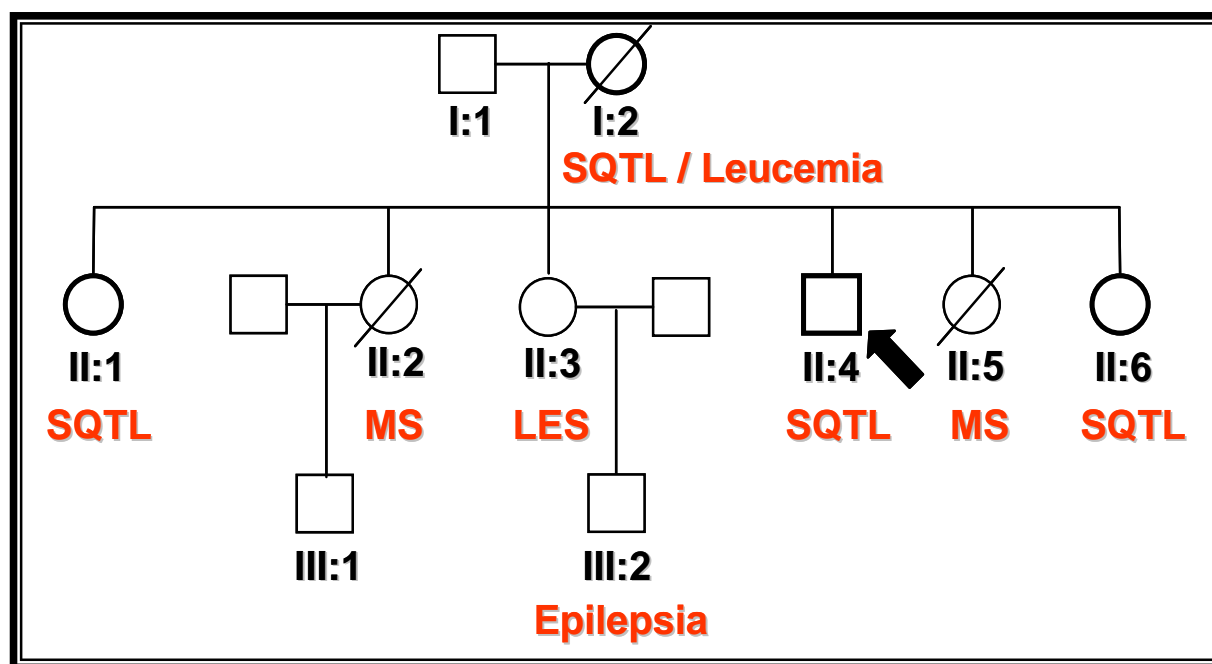


Figura V.1. Pedigrí de la familia objeto de estudio. La flecha señala al probando. Los círculos y cuadrados representan género femenino y masculino, respectivamente. Las líneas diagonales sobre los símbolos representan el fallecimiento de ese sujeto. SQTL: Síndrome QT Largo, MS: Muerte Súbita, LES: Lupus Eritematoso Sistémico.

Otra de las hermanas (**II:1, Figura V.1**) también fue diagnosticada de epilepsia a los 13 años de edad y tratada desde entonces con fenobarbital. Sin embargo, tras un episodio sincopal cuando se encontraba en reposo, se le realizó un ECG lo que evidenció que el valor del QTc era de 560 ms documentándose, además, rachas de taquicardia ventricular polimórfica. Estos resultados permitieron diagnosticar un SQTL instaurándose un tratamiento con atenolol (50 mg dos veces al día) e implantándose un marcapasos de doble cámara (DDD) para estabilizar la frecuencia cardiaca a 75 lpm. Posteriormente, a los 43 años sufrió una MSC de la que fue resucitada, por lo que se decidió implantar un desfibrilador cardioversor interno de doble cámara (DCI). Desde entonces no ha sufrido ningún otro episodio sincopal o MSC.

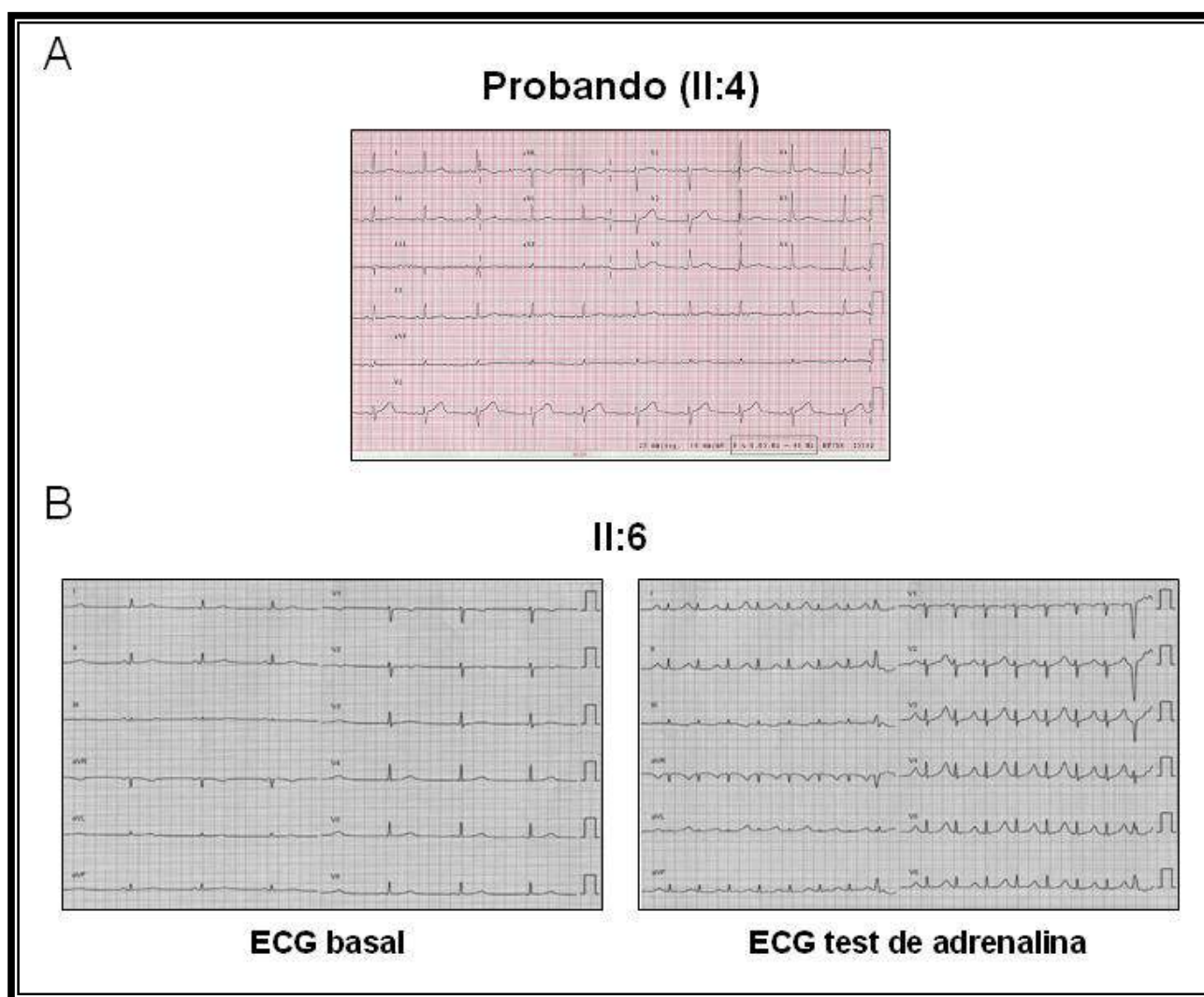


Figura V.2. ECGs de 12 derivaciones del probando (A) y la hermana II:6 (B) (velocidad del papel 25 mm/s). (A) El probando presentaba ritmo sinusal (68 bpm) con intervalos PR (168 ms) y QRS (88 ms) normales, aunque con un descenso en la amplitud y un aumento en la duración de las ondas T. El valor del QTc fue de 480 ms. (B) ECG de II:6 en condiciones basales (izquierda) y tras la inyección de un bolo de adrenalina (derecha). En condiciones basales, el ECG muestra intervalos PR y QRS normales (140 ms y 90 ms, respectivamente) aunque se detectó bradicardia sinusal (48 bpm) y un aumento en la amplitud de las ondas T registradas a bajo voltaje (QTc 460 ms). El test de adrenalina (panel B, derecha) resultó positivo al producirse tras la administración un aumento del QT que alcanzó un valor de 618 ms, alternancia en la amplitud de las ondas T y la aparición de extrasístoles polimórficas ventriculares. Los test de adrenalina realizados a los miembros de la familia se realizaron siguiendo el protocolo descrito en estudios previos (Shimizu y cols., 2003).

La hermana **II:3** (**Figura V.1**) no presentaba síntomas de enfermedad cardíaca. Su ECG presentaba valores de PR, QRS y QTc normales encontrándose en ritmo sinusal (68 bpm). Al realizarle una ecocardiografía, una ergometría, una prueba de Holter y un test de adrenalina, no se identificó ninguna alteración estructural o eléctrica. Sin embargo, esta hermana padece lupus eritematoso sistémico, con una disminución moderada en la función renal lo que hace que su potasemia sea de 5.2 mEq/L. Además, se encuentra actualmente en tratamiento con prednisona, hidroxiclороquina, micofenolato, y espironolactona (25 mg día). La discreta hiperpotasemia que

presenta tiende a acelerar la repolarización ventricular acortando el QT, por lo que podría darse el caso que también tuviera un SQTl pero que estuviese siendo enmascarado. Por último, la hermana **II:6 (Figura V.1)** era también asintomática y en el ECG se demostró que presentaba un PR (140 ms) y QRS (90 ms) normales. Sin embargo, tenía bradicardia sinusal (48 lpm) y un QTc de 460 ms (discretamente prolongado) (**Figura V.2, panel B izquierda**). Por ello, se decidió realizar un test de adrenalina en el que se observó una prolongación del intervalo QTc (618 ms), un efecto de alternancia en la amplitud de las ondas T y la aparición de extrasístoles polimórficas ventriculares (**Figura V.2, panel B derecha**). En consecuencia, a dicha paciente también se le diagnosticó un SQTl y, dados los antecedentes, se decidió implantar un DCI e iniciar un tratamiento con bisoprolol.

La madre del probando (**I:2, Figura V.1**) presentaba un ECG con valores dentro de la normalidad, sin embargo, fue también diagnosticada de SQTl tras experimentar un episodio de MSC resucitada durante una terapia con antibióticos (piperacilina/tazobactam, ciprofloxacino y trobamicina) para el tratamiento de una neumonía en el curso de una leucemia aguda de la que estaba siendo tratada con idarubicina y citarabina. Por tanto, se le implantó un DCI pero falleció poco tiempo después debido a la leucemia. El padre del probando (**I:1, Figura V.1**) era y es asintomático y tiene un ECG normal.

El probando tiene dos sobrinos (**III:1 y III:2, Figura V.1**). Al sobrino **III:1** se le realizaron en la infancia las mismas pruebas cardiológicas que al resto de familiares (ECG, ecocardiografía, ergometría, y Holter) y los resultados revelaron un corazón eléctrica y funcionalmente normal. Más tarde a los 23 años se sometió a un test de adrenalina que resultó negativo. El sobrino **III:2** padecía episodios epilépticos desde que tenía 2 años. A partir de los 6 años fue tratado con oxcarbacepina y desde entonces no experimentó nuevos episodios. Su ECG, Holter, ecocardiograma y prueba de esfuerzo presentan valores dentro de la normalidad.

2. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS VARIANTES

El SQTl es cardiomiopatía arritmogénica hereditaria primaria, es decir, una enfermedad causada por la alteración de las propiedades eléctricas del corazón que no es secundaria a una enfermedad cardíaca estructural y que está genéticamente determinada (Roden, 2008; Tester y Ackerman, 2014; Napolitano y cols., 2015; Havakuk y Viskin, 2016). Con el fin de identificar la/s mutación/es responsables del SQTl en la familia, se procedió a la secuenciación masiva de última

generación del ADN extraído a partir de las muestras de sangre del probando. Previamente a la secuenciación, se procedió al aislamiento y a la construcción de librerías perfectamente etiquetadas e identificadas con el ADN del sujeto. Las librerías fueron secuenciadas por la empresa NIMGenetics utilizando un panel de secuenciación masiva personalizado HaloPlex (216,105 kb) diseñado a partir del programa SureDesign (Agilent Technologies) y en el que se incluyeron las regiones codificantes y los extremos transcritos pero no traducidos (5' y 3'UTRs) de los 82 genes mostrados en la **Tabla IV.1** (ver Materiales y Métodos). Además de los ya asociados con síndromes genéticos arritmogénicos hereditarios primarios, se incluyeron también genes que codifican factores de transcripción, otros canales iónicos, proteínas de anclaje, enzimas y diversas proteínas que forman parte de los canalosomas localizados en la membrana de miocitos cardiacos. Ninguno de ellos había sido asociado con la aparición de SQTL hasta la fecha. Una vez identificadas las variantes en el probando, se genotipó también al resto de familiares en primer grado que dieron su consentimiento bien utilizando el chip de secuenciación masiva o bien por el método de Sanger.

Tanto el probando (**II:4**) como las hermanas **II:1** y **II:6** son portadoras de una mutación en heterocigosis en la región codificante del gen *KCNH2* que consiste en la duplicación de una citosina localizada en la posición 453 (NM_000238.3:c.453dupC) (**Figura V.3 y V.4**).

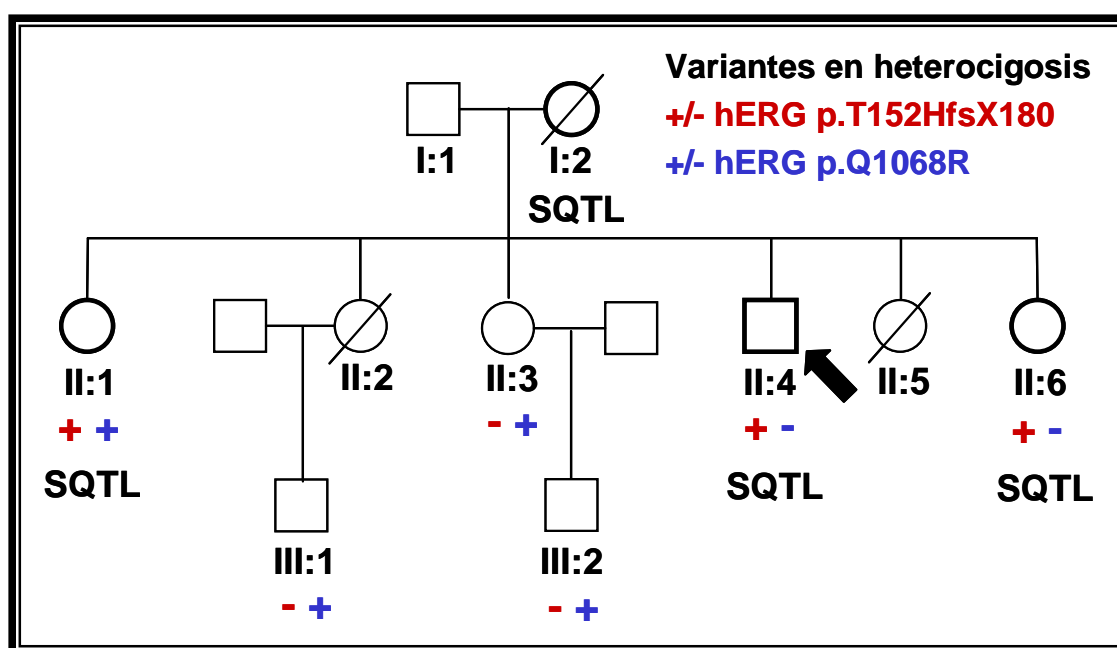


Figura V.3. Pedigrí de la familia de estudio genotipada con las mutaciones hERG p.T152HfsX180 y hERG p.Q1068R. La flecha señala el probando. Los círculos y cuadrados representan género femenino y masculino, respectivamente. Las líneas diagonales sobre los símbolos representan el fallecimiento de ese sujeto. Los signos (+) y (-) representan aquellos sujetos con o sin la mutación hERG p.T152HfsX180 (rojo) o hERG p.Q1068R (azul), respectivamente. SQTL: Síndrome QT Largo.

La variante produce la sustitución de una treonina por una histidina en la posición 152 localizada en el dominio N-terminal de los canales hERG. Dicho cambio implica el desplazamiento del marco de lectura, de forma que después de la mutación se incorporan 180 aminoácidos y luego se trunca la proteína porque aparece un codón prematuro de parada de la traducción (p.T152HfsX180 hERG). El resultado es un péptido de 332 aminoácidos en lugar de los 1159 residuos que corresponden a la proteína nativa (**Figura V.5**).

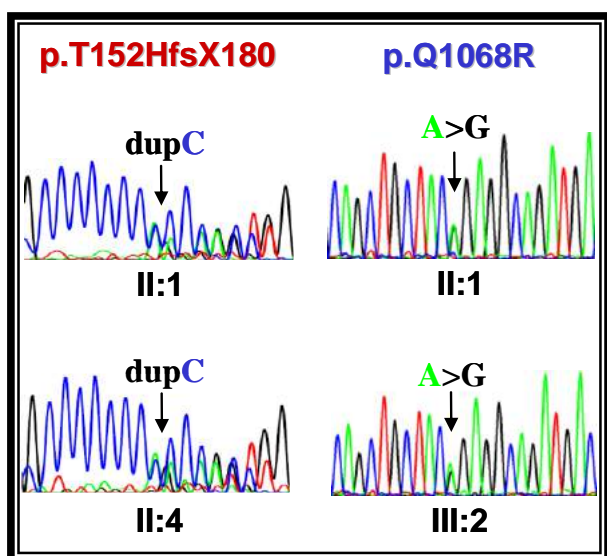


Figura V.4. Cromatogramas **II:1** (hermana del probando), **II:4** (probando) y **III:2** (sobrino). Fragmentos de la secuenciación del gen *KCNH2*, en los diferentes sujetos donde se aprecian la mutación en heterocigosis c.453dupC (p.T152HfsX180) y la variante c.3203A>G (p.Q1068R), señalizadas mediante flechas. Cada pico representa la secuenciación de un nucleótido, de tal manera que los picos verdes son adeninas, los rojos timinas, los azules citosinas, y los negros las guaninas. Los cromatogramas fueron obtenidos empleando el programa Chromas Lite (chromas.software.informer.com/2.4/).

Las hermanas **II:1** y **II:3** y los sobrinos del probando (**III:1** y **III:2**) son portadores de otra variante en el gen *KCNH2* (NM000238.3:c.3203A>G) (**Figura V.3**). En este caso se trata de una mutación con cambio de sentido que produce la sustitución de una adenina por una citosina en la posición 3203 de la región codificante de dicho gen (**Figura V.4**) que da lugar a la expresión de una proteína hERG en la que la glutamina en posición 1068 queda sustituida por una arginina (p.Q1068R). Por tanto, la paciente **II:1** parece ser portadora de la mutación p.T152HfsX180 en un alelo y de la p.Q1068R en el otro (*heterocigosis compuesta*) ya que la recombinación es un evento muy raro tras la fecundación.

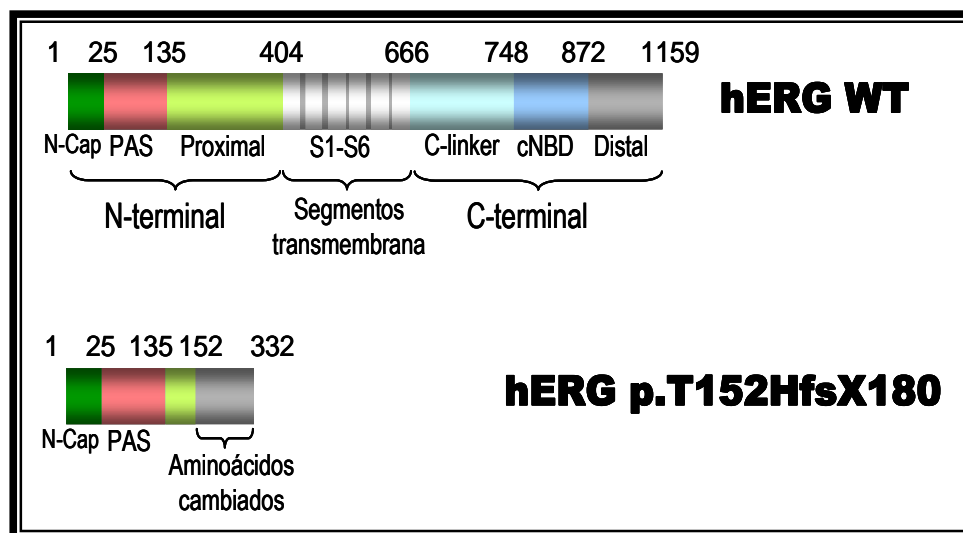


Figura V.5. Representación esquemática de los principales dominios de las proteínas hERG WT y hERG p.T152HfsX180. Los canales hERG WT presentan en el extremo N-terminal un dominio *eag* compuesto a su vez por la región PAS (sensor de señales) más la región *cap* protectora. En el extremo C-terminal presentan el dominio de unión a nucleótidos cíclicos (*cNBD*). La región central está compuesta por las seis subunidades que forman los segmentos transmembrana del canal (S1-S6) (Morais-Cabral y Robertson., 2015). Sin embargo, hERG p.T152HfsX180 es un péptido truncado que sólo posee las secuencias N-Cap y PAS y parte de la región proximal del dominio N-terminal.

La mutación p.Q1068R es considerada una variante “rara” al aparecer con una frecuencia alélica menor al 1% (0.03%) en la población de origen africano, como era el caso de la familia objeto de estudio (**Tabla IV.2**, ver Materiales y Métodos). En el año 2004, Ansel y colaboradores analizaron las características electrofisiológicas de los canales hERG p.Q1068R y demostraron que dicha variante aceleraba de manera significativa la inactivación y la recuperación de la inactivación de forma que las constantes de tiempo de estos procesos se desplazan aproximadamente 10-20 mV en su dependencia de voltaje con respecto a las de los canales WT (Anson y cols., 2004). Sin embargo, un estudio posterior demostró que dicha variante carecía de patogenicidad y, por tanto, no estaba implicada en la aparición de SQT en aquellos individuos que la portaban (Kapa y cols., 2009).

El probando (**II:4**), dos de sus hermanas (**II:3** y **II:6**), y uno de los sobrinos (**III:2**) portaban una mutación en heterocigosis que produce la sustitución de una citosina por una timina en la posición 931 (NM_001077653.2:c.931C>T) en el exón 7 del gen *TBX20* (**Figura V.6 y V.7**).

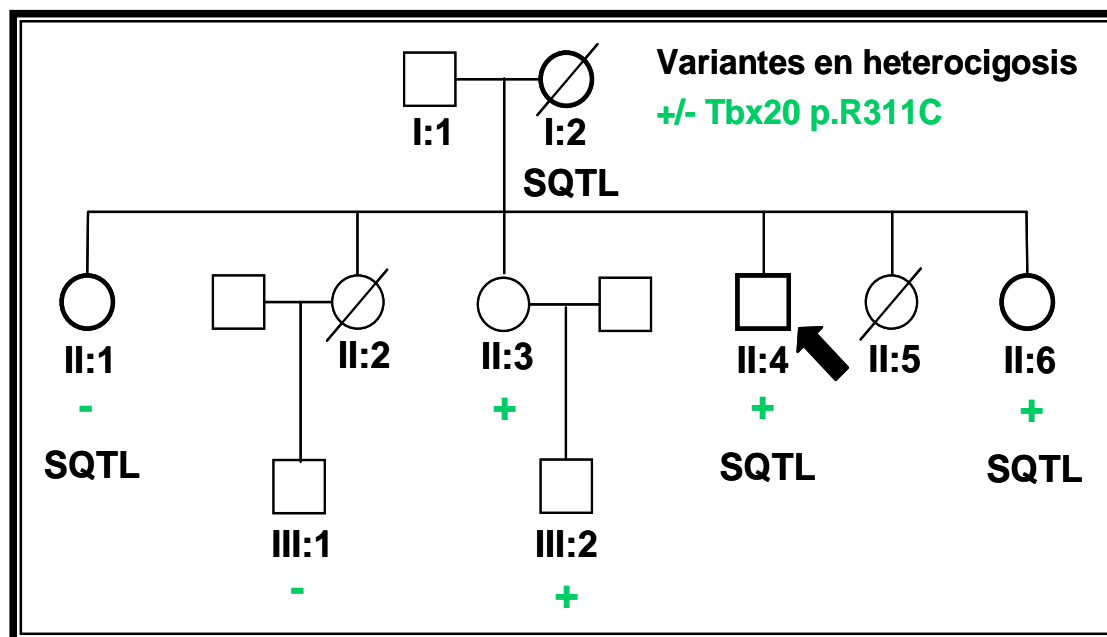


Figura V.6. Pedigrí de la familia de estudio genotipada con la mutación *Tbx20* p.R311C. La flecha señala el probando. Los círculos y cuadrados representan género femenino y masculino, respectivamente. Las líneas diagonales sobre los símbolos representan el fallecimiento de ese sujeto. Los signos (+) y (-) representan aquellos sujetos con o sin la mutación *Tbx20* p.R311C. SQTL: Síndrome QT Largo.

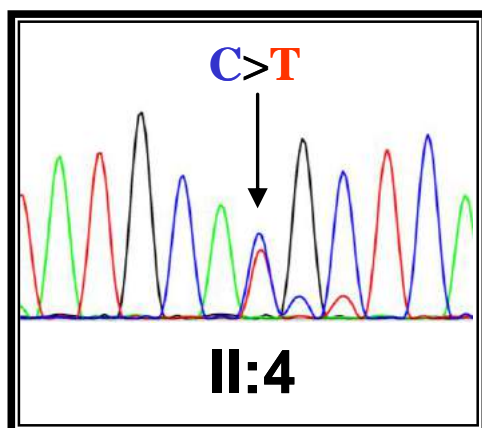


Figura V.7. Cromatograma del probando II:4. Fragmento de secuenciación del gen *TBX20*, donde se incluye la mutación en heterocigosis c.931C>T, señalizada con una flecha. Cada pico representa la secuenciación de un nucleótido, de tal manera que los picos verdes son adeninas, los rojos timinas, los azules citosinas, y los negros las guaninas. El cromatograma fue obtenido empleando el programa Chromas Lite (chromas.software.informer.com/2.4/).

La mutación produce la sustitución de la arginina en posición 311 por una cisteína en el factor de transcripción *Tbx20* (**Tabla IV.2**, ver Materiales y Métodos). Esta arginina se encuentra muy conservada entre diferentes especies (**Figura V.8, panel A**) y está localizada en la región transactivadora de dicho factor (**Figura V.8, panel B**).

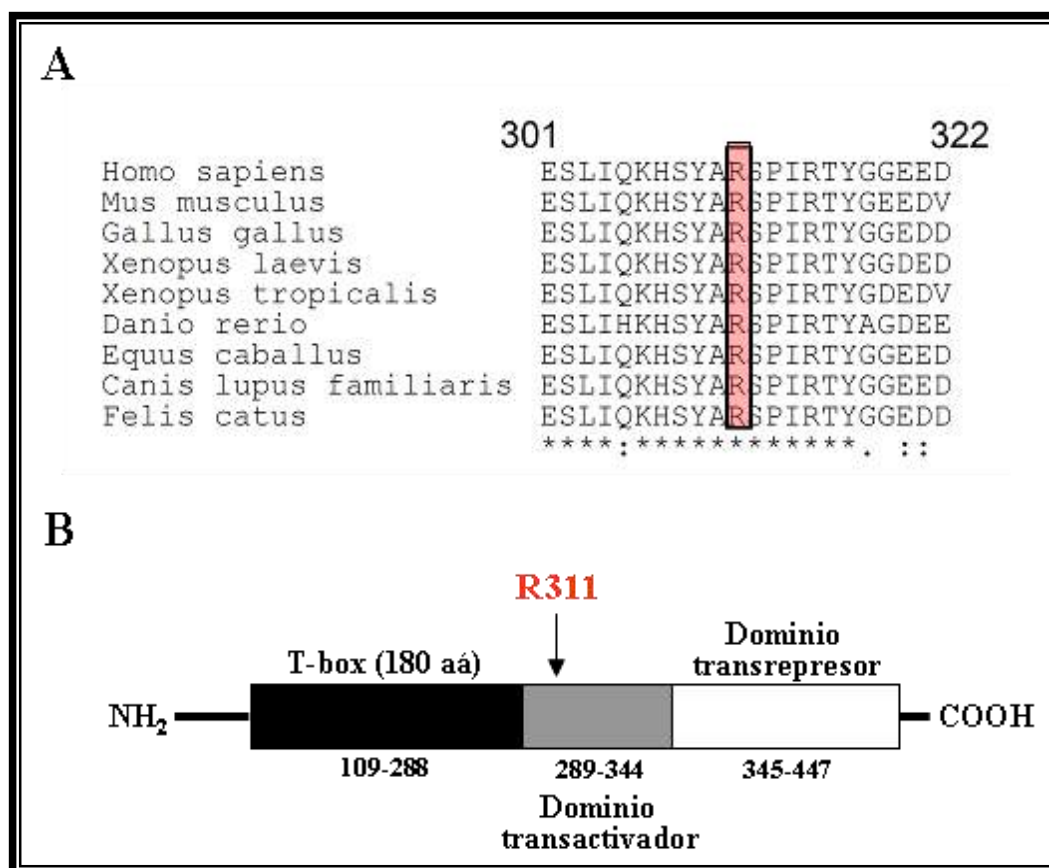


Figura V.8. La arginina en posición 311 del factor Tbx20 se encuentra muy conservada en las distintas especies y está localizada en el dominio transactivador de dicha proteína. (A) Alineamiento de la secuencia comprendida entre los aminoácidos 301 y 322 de Tbx20. Además de la arginina, el resto de aminoácidos comprendidos en estas posiciones se encuentran muy conservados entre las diferentes especies. (B) Representación esquemática del factor Tbx20 con sus respectivos dominios transactivador y transrepresor, así como la secuencia T-box, próxima al extremo N-terminal, mediante la cual Tbx20 puede unirse a las secuencias consenso en el ADN diana.

Al igual que sucede con el mutante hERG p.Q1068R, Tbx20 p.R311C también se considera una variante “rara”, ya que ha sido descrita con una frecuencia alélica del 0.01% en la población Africana (**Tabla IV.2**, ver Materiales y Métodos).

Por último, el probando (**II:4**), una de sus hermanas (**II:6**) y uno de sus sobrinos (**III:1**) también presentaron una variante en heterocigosis en el extremo 5'UTR del gen *KCNN3* que produce la sustitución de una adenina por una guanina (NM_001204087.1:c.-66A>G) (**Figura V.9 y V.10**) localizada 66 pares de bases antes del codón de iniciación de la traducción, concretamente en la región promotora de dicho gen (**Tabla IV.2**, ver Materiales y Métodos).

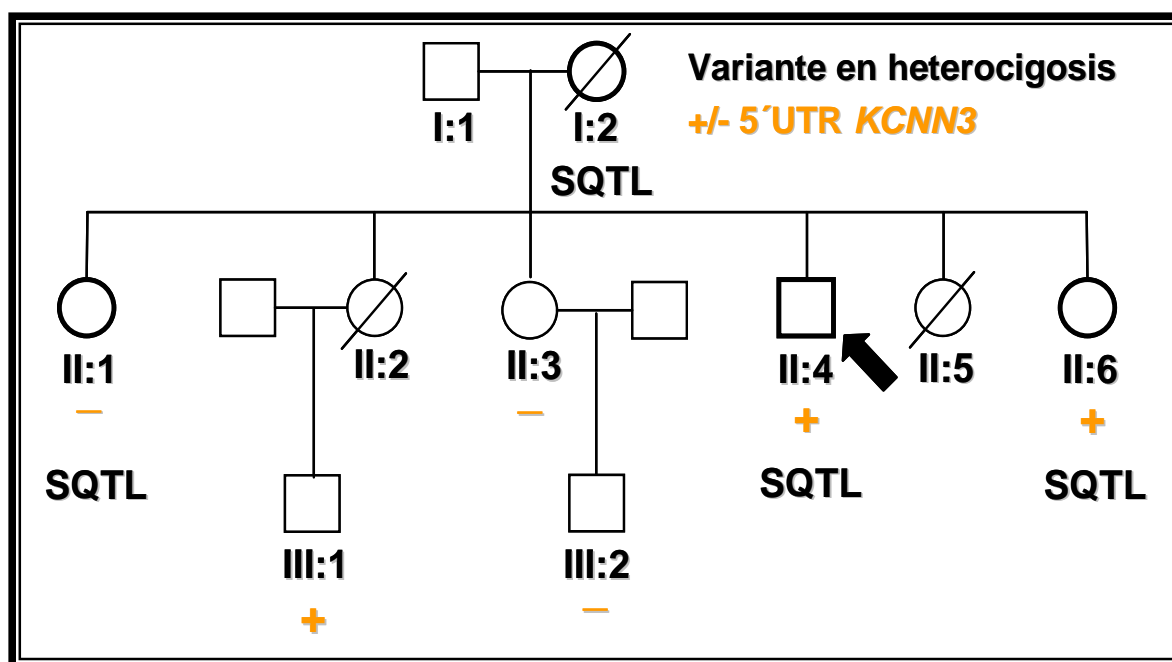


Figura V.9. Pedigrí de la familia. La flecha señala el probando. Los círculos y cuadrados representan género femenino y masculino, respectivamente. Las líneas diagonales sobre los círculos representan el fallecimiento de ese sujeto. Los signos (+) y (-) representan aquellos sujetos con o sin la mutación c.-66A>G en la región 5' UTR en la región promotora de *KCNN3*. SQTL: Síndrome QT Largo.

El gen *KCNN3* codifica la subunidad α del canal de potasio de baja conductancia activado por Ca^{2+} tipo 3 (SK3), el cual se encuentra implicado en la fase de repolarización del PA auricular humano (Nagy y cols., 2009; Chang y Chen, 2015). A pesar de que esta proteína también se expresa en los ventrículos, su implicación en el PA ventricular sólo ha sido descrita en condiciones patológicas (Nagy y cols., 2009; Adelman y cols., 2012; Chang y Chen, 2015).

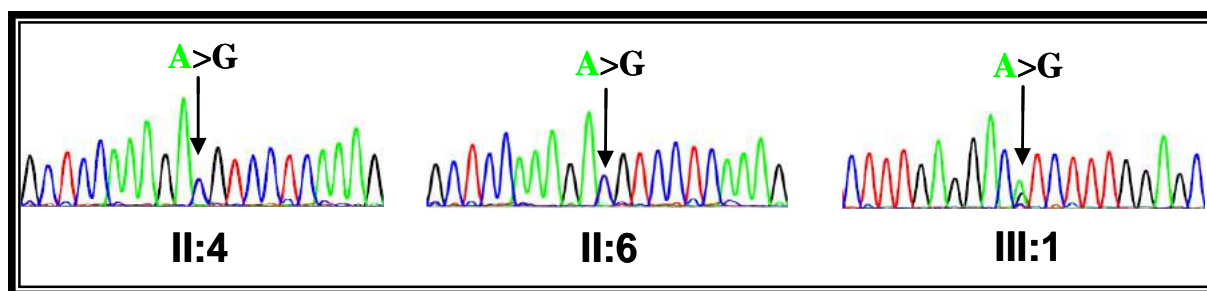


Figura V.10. Cromatogramas del probando II:4, su hermana II:6, y su sobrino III:1, respectivamente. Fragmentos de la secuenciación de la región promotora del gen *KCNN3* en los diferentes sujetos, donde se incluye, en los tres casos, la mutación en heterocigosis c.-66A>G, señalizada con flechas. Cada pico representa la secuenciación de un nucleótido, de tal manera que los picos verdes son adeninas, los rojos timinas, los azules citosinas, y los negros las guaninas. El cromatograma fue obtenido empleando el programa Chromas Lite (chromas.software.informer.com/2.4/).

En el probando también se identificaron otras variantes que están recogidas en la **Tabla IV.2** (ver Materiales y Métodos). A diferencia de las mutaciones en los genes *KCNH2* y *TBX20*, estas variantes son consideradas SNPs, ya que aparecen en más del 1% de la población. Asimismo, al utilizar programas de predicción de patogenicidad tales como PROVEAN o SIFT, demostramos que son mutaciones de carácter “neutro o toleradas”, es decir, su aparición no supone un incremento en el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular en el individuo afectado. Por este motivo, estas mutaciones no fueron incluidas en el estudio funcional porque no podían ser responsables de la aparición de SQTl en los sujetos afectados de la familia de estudio.

3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN hERG p.T152HfsX180

De las tres principales variantes génicas identificadas como posibles responsables de la aparición de SQTl en la familia de estudio, nuestra primera hipótesis fue considerar la mutación en los canales hERG (p.T152HfsX180) como altamente patogénica y responsable de la aparición de la enfermedad. En consecuencia, se llevó a cabo un análisis funcional de dicha mutación en células CHO, y HL-1 y se desarrolló un modelo matemático *in silico*, previamente validado, con el fin de simular los posibles efectos producidos por la mutación sobre las características del PA ventricular humano.

3.1. Características electrofisiológicas de la I_{hERG} generada en células CHO

En primer lugar, se transfectaron transitoriamente células CHO con el ADNc que codifica los canales hERG WT (1 μ g) o p.T152HfsX180 (1 μ g) registrándose la I_{hERG} generada mediante la técnica de *patch-clamp*. Para ello, se aplicaron pulsos de 5 s de duración en incrementos de 10 mV entre -80 y +60 mV, desde un potencial de fijación de -80 mV. Las corrientes de cierre fueron obtenidas al repolarizar la membrana a -60 mV durante otros 5 s (Caballero y cols., 2003; Amorós y cols., 2011). Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron al valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente (pA/pF). Como se puede observar en el **panel A** de la **Figura V.11**, los canales hERG WT ($n = 7$ experimentos/células) generaron una corriente de activación lenta cuya amplitud aumentó progresivamente hasta alcanzar un máximo a 0 mV, para luego, a potenciales >0 mV, disminuir progresivamente. A potenciales >0 mV la velocidad de inactivación tipo C del canal es mayor que la de activación, lo que hace que disminuya la corriente máxima activada. En el **panel A** también se observa que las células CHO

transfectadas con canales hERG p.T152HfsX180 no generaron en absoluto corriente ($P < 0.05$, $n = 6$ experimentos/células).

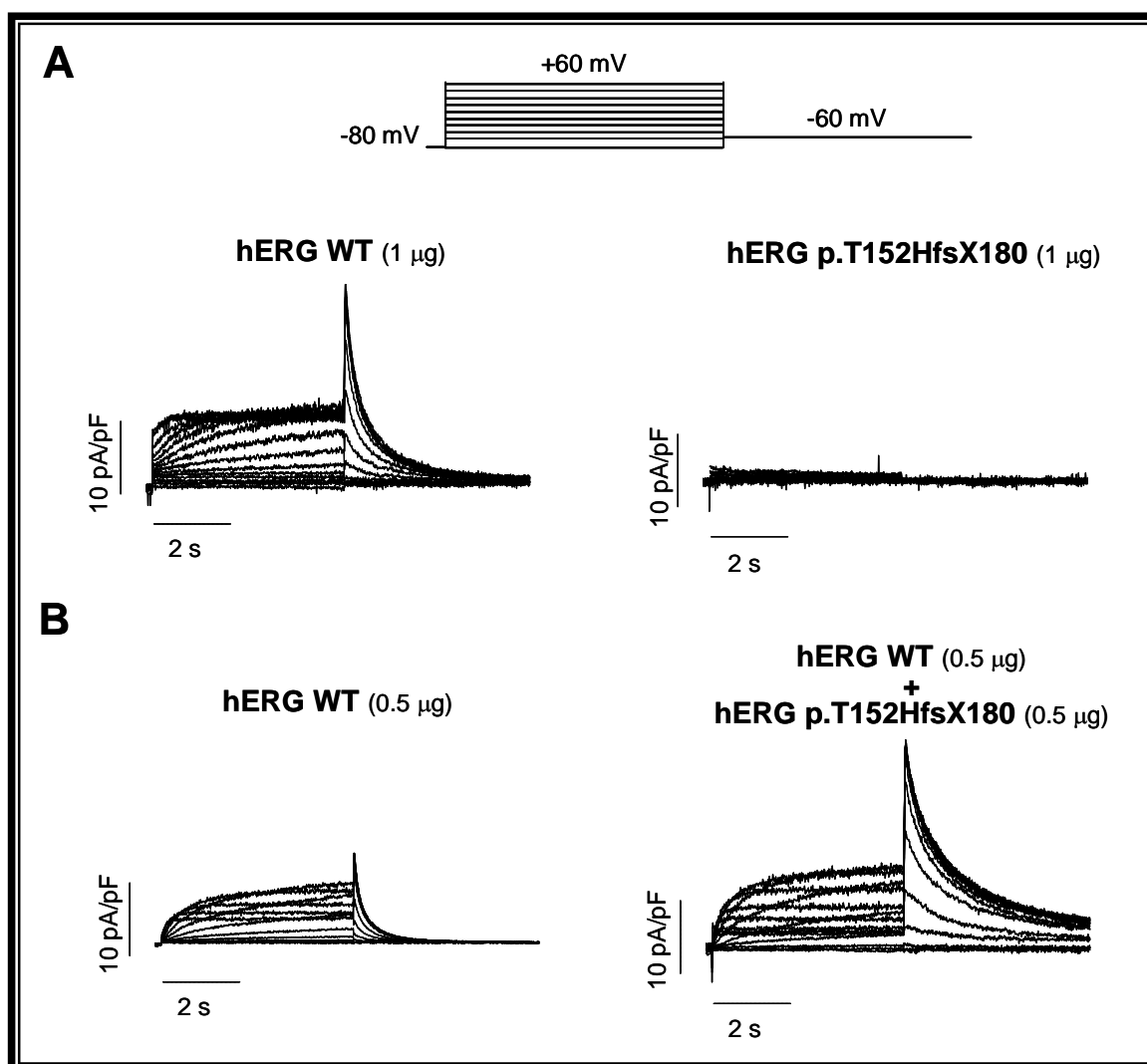


Figura V.11. Características electrofisiológicas de la I_{hERG} registrada en células CHO. (A) Familias de trazos de la I_{hERG} registradas en dos células CHO tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior y transfectadas con los canales hERG WT (1 µg) o p.T152HfsX180 (1 µg). (B) Familias de trazos de la I_{hERG} registradas en dos células CHO tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior y transfectadas con los canales hERG p.T152HfsX180 (0.5 µg) o cotransfectadas con canales hERG WT y p.T152HfsX180 (0.5+0.5 µg).

Dado que la mutación aparecía en heterocigosis en los pacientes portadores, también se realizaron experimentos en los que en las células CHO se cotransfectaron canales hERG WT y p.T152HfsX180. En estas condiciones es de esperar que la I_{hERG} fuera como mucho la mitad de la generada por 1 µg de ADNc de los canales WT. Sin embargo, en algunas ocasiones los canales codificados por el alelo mutado producen EDN. Es decir, el péptido mutante ejerce de “proteína venenosa” atrapando consigo a los canales WT en el aparato de Golgi o en el retículo endoplásmico. Diversas mutaciones de los canales hERG producen EDN y se ha descrito que dichas

mutaciones suelen ser responsables de fenotipos más agresivos de la enfermedad. En el **panel B** de la **Figura V.11** se muestra una familia de trazos de la I_{hERG} obtenida en células CHO transfectadas de forma transitoria con el ADNc que codifica los canales hERG WT (0.5 μ g) o bien cotransfectadas con ambos canales WT + p.T152HfsX180 (0.5+0.5 μ g). Sorprendentemente, la I_{hERG} generada por las células cotransfectadas ($n = 17$ experimentos/células) no se diferenciaba de la generada por los canales hERG WT (1 μ g) ($P > 0.05$). De hecho, su amplitud era el doble de la generada por las células transfectadas con hERG WT a la dosis de 0.5 μ g ($P < 0.05$).

El análisis de las cinéticas de activación y deactivación se realizó a partir del ajuste de una función monoexponencial a los trazos de corriente máxima generada a 0 mV y del ajuste de una función biexponencial a los trazos de las corrientes de cierre generados tras aplicar pulsos a +60 mV, respectivamente. Este procedimiento permitió obtener las constantes de tiempo (τ) de activación y deactivación que se muestran en la **Tabla V.1**. Como se puede observar, la activación y deactivación de la I_{hERG} generadas por la cotransfección de canales WT + p.T152HfsX180 era significativamente más rápida y más lenta, respectivamente que las de la I_{hERG} generada por la canales WT hERG ($P < 0.05$) (**Tabla V.1**).

Células CHO	I_{hERG}				
	τ_{act} (ms)	V_{hact} (mV)	k_{act}	τ_{fdeact} (ms)	τ_{sdeact} (ms)
hERG WT (1 μ g)	1887 \pm 307	-9.5 \pm 2.5	12.8 \pm 0.8	265 \pm 15	1229 \pm 91
hERG WT + p.T152HfsX180 (0.5 μ g + 0.5 μ g)	1136 \pm 140*	-9.1 \pm 1.6	11.1 \pm 0.6	404 \pm 58*	1571 \pm 181

Tabla V.1. Parámetros de la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{hERG} registrada en células CHO transfectadas con hERG WT o cotransfectadas con hERG WT + p.T152HfsX180. τ_{act} , constante de tiempo de la cinética de activación; V_{hact} y k_{act} , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación; τ_{fdeact} y τ_{sdeact} , constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*) de la cinética de deactivación. Cada valor representa la media \pm EEM de $n \geq 6$ experimentos/células. * $P < 0.05$ frente a hERG WT.

Representamos también las curvas densidad de corriente-voltaje (I-V) para cada grupo experimental, obtenidas al medir la densidad de la I_{hERG} al final de cada pulso en función del potencial del pulso aplicado (**Figura V.12**). Se puede observar que las curvas de densidad de corriente-voltaje presentan una morfología de campana, típica de los canales hERG (Sanguinetti y cols., 1995) confirmando que la I_{hERG} presenta una marcada rectificación interna. Además, se confirma que aquellas células transfectadas únicamente con los canales hERG p.T152HfsX180 no generaron en absoluto corriente. Por otro lado, la densidad de la I_{hERG} generada por las células cotransfectadas con canales hERG WT y p.T152HfsX180 (0.5+0.5 μ g) no se diferenció de aquella

generada por los canales hERG WT ($1 \mu\text{g}$) a ninguno de los potenciales ensayados. De hecho, al igual que se observa en los registros de corriente de la **Figura V.11**, su densidad fue el doble de la generada por las células transfectadas con hERG WT a la dosis de $0.5 \mu\text{g}$ ($P < 0.05$).

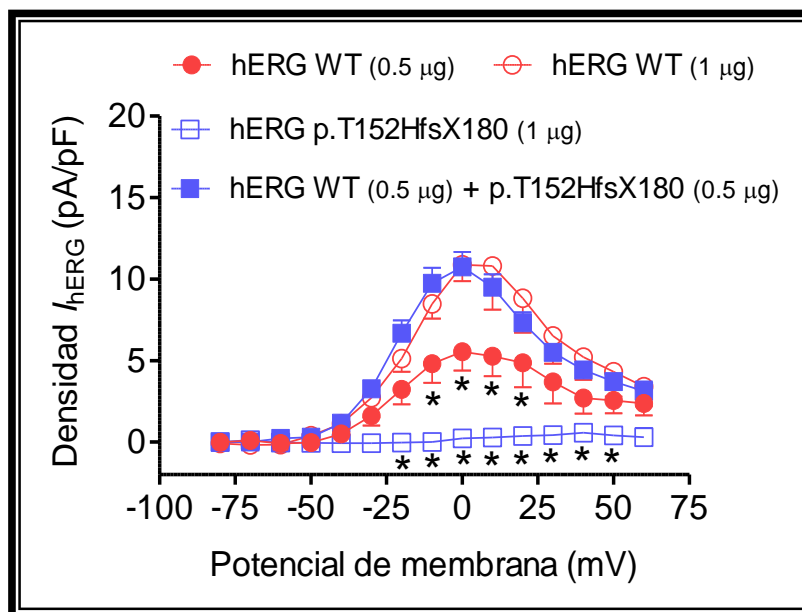


Figura V.12. Relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la I_{hERG} registrada en células CHO. Las células fueron transfectadas con hERG WT ($0.5 \mu\text{g}$ y $1 \mu\text{g}$), hERG p.T152HfsX180 ($1 \mu\text{g}$) o cotransfectadas con ambos canales WT + p.T152HfsX180 ($0.5 + 0.5 \mu\text{g}$). Cada curva fue obtenida al representar la densidad de la corriente medida al final del pulso en función del potencial del pulso aplicado. Cada punto representa la media \pm EEM de ≥ 6 experimentos/células. * $P < 0.05$ frente a hERG WT ($1 \mu\text{g}$) y frente a hERG WT + p.T152HfsX180 ($0.5 + 0.5 \mu\text{g}$).

En el **panel A** de la **Figura V.13** se muestran las curvas de activación de los canales hERG WT y p.T152HfsX180. Estas curvas representan la dependencia de voltaje de la transición desde el estado cerrado al estado abierto del canal. Las curvas se obtuvieron al representar la densidad de las corrientes de cierre frente al potencial de membrana del pulso previo. El ajuste de una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el punto medio (V_{hact}) y la pendiente (k_{act}) para cada experimento (**Tabla V.1**). Como se puede apreciar, las corrientes de cierre generadas por las células cotransfectadas no se diferenciaron de la generada por los canales hERG WT ($1 \mu\text{g}$) ($P > 0.05$). De hecho, la densidad obtenida fue significativamente mayor que la generada por células transfectadas con hERG WT a la dosis de $0.5 \mu\text{g}$ ($P < 0.05$). Asimismo, dicha densidad resultó significativamente mayor que aquella generada en células transfectadas únicamente con el péptido mutante (**Figura V.13, panel B**) ($P < 0.01$). La cotransfección con hERG p.T152HfsX180 no modificó la dependencia de voltaje de la activación de los canales hERG WT ($P > 0.05$) (**Tabla V.1**).

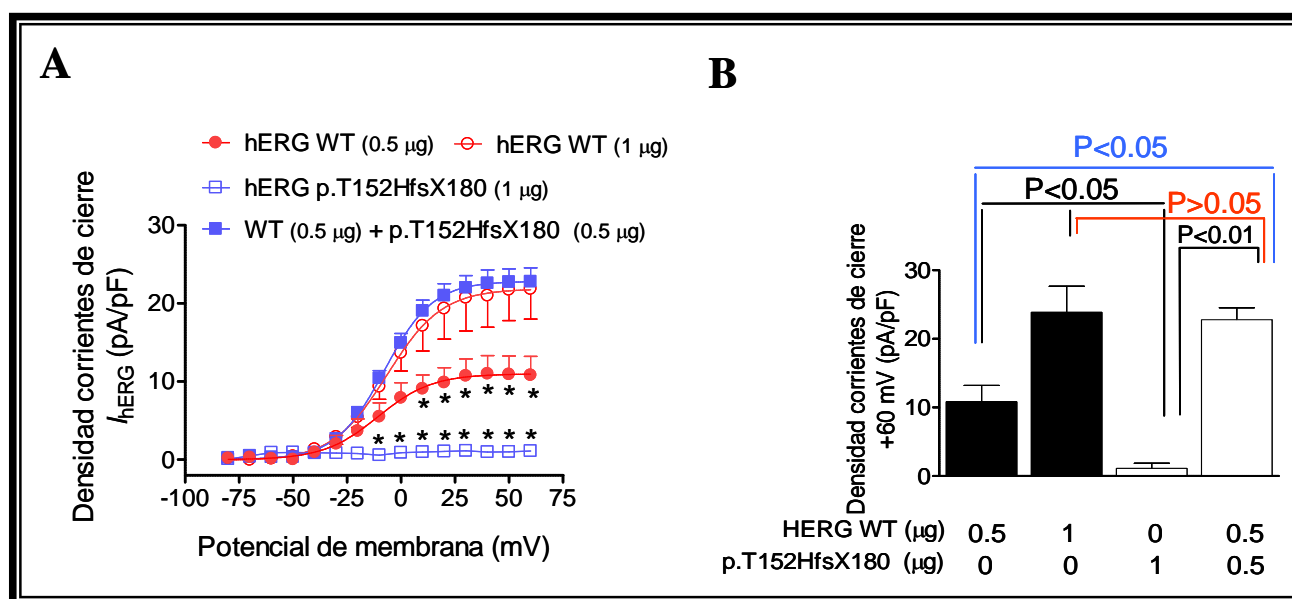


Figura V.13. Dependencia de voltaje de la activación de la I_{hERG} generada en células CHO. (A) Curvas de activación de la I_{hERG} generada en células CHO transfectadas con hERG WT (0.5 y 1 μg), p.T152HfsX180 (1 μg) o cotransfectadas con ambos canales WT + p.T152HfsX180 (0.5 + 0.5 μg). Cada curva fue representada a partir de la densidad de las corrientes de cierre en función del potencial de membrana del pulso previo. El ajuste mediante una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el punto medio (V_{hact}) y la pendiente (k_{act}) para cada curva. (B) Densidad de las corrientes de cierre registradas tras aplicar un pulso a +60 mV en células transfectadas con los canales hERG según se indica en el eje de abscisas. En (A) y (B) cada punto/barra representa la media \pm EEM de ≥ 6 experimentos/células. * $P < 0.05$ frente a hERG WT (1 μg) y frente a hERG WT + p.T152HfsX180 (0.5 + 0.5 μg).

Nuestros resultados sugieren que el péptido hERG p.T152HfsX180 no ejerce un *efecto dominante negativo* sino que, por el contrario, podría estar produciendo un *efecto chaperona* sobre los canales hERG WT, aumentando la expresión de éstos en la membrana plasmática.

3.2. Características electrofisiológicas de la I_{Kr} generada en células HL-1

Con el fin de confirmar la existencia de un *efecto chaperona*, se transfectaron de manera transitoria células HL-1 con el ADNc que codifica los canales hERG p.T152HfsX180 a dos dosis diferentes (0.5 μg y 1 μg). La I_{Kr} nativa fue registrada mediante la técnica de *patch-clamp* al aplicar un protocolo de pulsos de 5 s de duración en incrementos de 10 mV entre -80 y +60 mV, desde un potencial de fijación a -80 mV. Las corrientes de cierre fueron obtenidas al repolarizar la membrana a -60 mV durante otros 5 s. Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron al valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente (pA/pF).

En aproximadamente un tercio de las células HL-1 (36%) la I_{Kr} fue la principal corriente repolarizante (células I_{Kr} -predominantes), mientras que en un 27% la principal corriente repolarizante de salida de K^+ presentaba rectificación tardía y se activaba lentamente (I_{Ks}) (células I_{Ks} -predominantes). Por último, otro 36% presentaba tanto I_{Kr} como I_{Ks} (células intermedias). Dado

que la dofetilida es un inhibidor selectivo de la I_{Kr} , ésta fue registrada en células I_{Kr} -predominantes e intermedias como “corriente sensible a dofetilida” (1 μ M). Para ello, su amplitud se medía como la diferencia entre la corriente total, registrada con la solución externa carente de dofetilida, y la registrada en presencia de dicho fármaco.

En la **Figura V.14** se muestra una familia representativa de trazos de la I_{Kr} generada en células HL-1 transfectadas o no (-) con hERG p.T152HfsX180 a una dosis de 1 μ g (**Panel A**). Como se puede observar, la transfección con hERG p.T152HfsX180 aumentó la amplitud de la I_{Kr} registrada con respecto a las células sin transfectar.

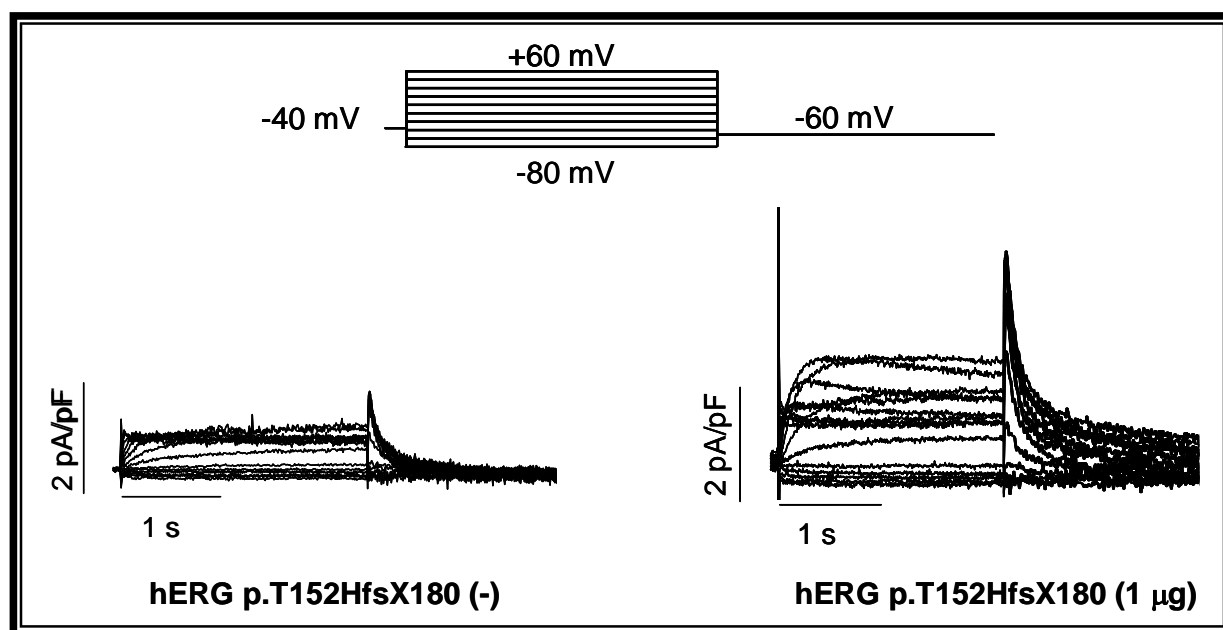


Figura V.14. Características electrofisiológicas de la I_{Kr} generada en células HL-1. En la figura se muestra una familia representativa de trazos de la I_{Kr} registrada en dos células HL-1 transfectadas o no con hERG p.T152HfsX180 (1 μ g) al aplicar el protocolo mostrado en la parte superior.

En el **panel A** de la **Figura V.15** se muestran las curvas de activación de la I_{Kr} registradas en células HL-1 transfectadas o no con hERG p.T152HfsX180 a 0.5 μ g y 1 μ g. El ajuste de una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el punto medio (V_{hact}) y la pendiente (k_{act}) para cada curva (**Tabla V.2**). Tanto la dosis de 0.5 como de 1 μ g de ADNc de p.T152HfsX180 aumentó significativamente la densidad de las corrientes de cierre, siendo mayor el aumento producido por la dosis de 1 μ g. De hecho, en el **panel B** de la misma figura se representa la densidad de las corrientes de cierre generadas tras aplicar un pulso a +60 mV. Como se puede apreciar, la transfección con hERG p.T152HfsX180 a dosis de 0.5 y 1 μ g aumentó del orden de aproximadamente 2 y 3 veces la densidad de las corrientes de cierre, respectivamente, con respecto a aquellas células sin transfectar ($P < 0.05$ en ambos casos).

Por otro lado, la transfección con el péptido mutante no modificó la dependencia de voltaje de la activación de la I_{Kr} a ninguna de las dosis empleadas (**Tabla V.2**).

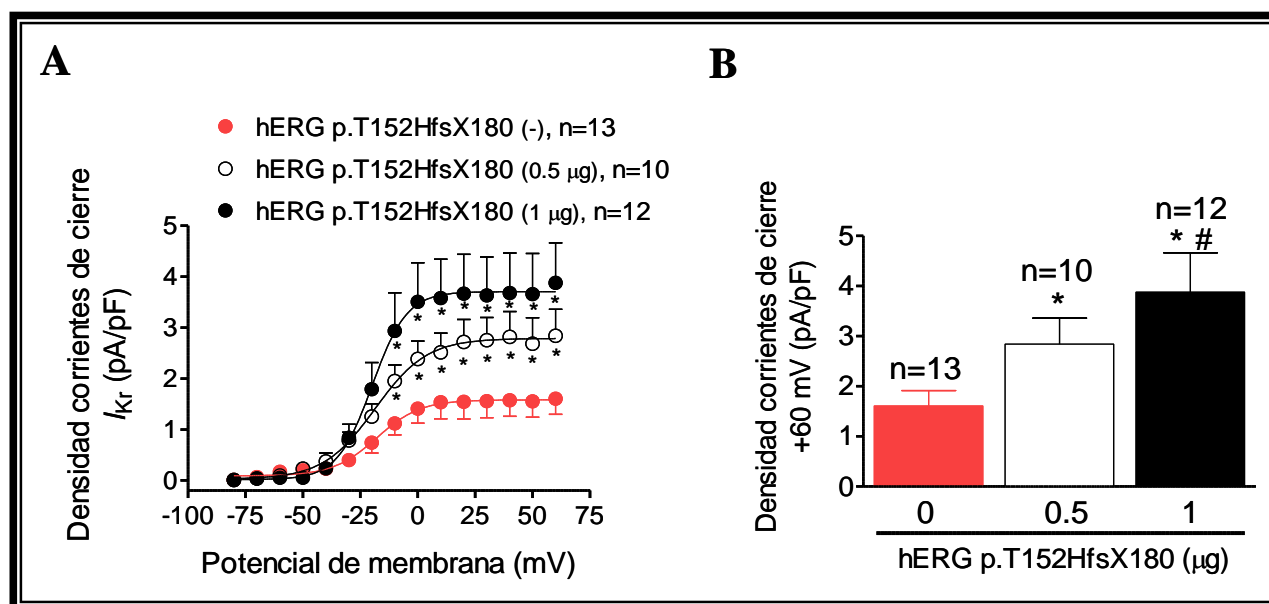


Figura V.15. Dependencia de voltaje de la activación de la I_{Kr} generada en células HL-1. (A) Curvas de activación de la I_{Kr} generada en células HL-1 transfectadas o no con hERG p.T152HfsX180 a dos dosis (0.5 y 1 µg). Cada curva fue representada a partir de la densidad de las corrientes de cierre en función del potencial de membrana del pulso previo. El ajuste mediante una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el V_{hact} y la k_{act} . (B) Densidad de las corrientes de cierre registradas tras aplicar un pulso a +60 mV en células HL-1 transfectadas o no con hERG p.T152HfsX180. En (A) y (B) cada punto/barra representa la media±EEM de “n” experimentos/células de cada grupo. * $P<0.05$ frente a células control sin transfectar y # $P<0.05$ frente a hERG p.T152HfsX180 (0.5 µg).

El análisis de las cinéticas de activación y deactivación se realizó a partir del ajuste de una función monoexponencial a los trazos de corriente máxima generada a 0 mV y del ajuste de una función biexponencial a los trazos de las corrientes de cierre generados tras aplicar pulsos a +60 mV, respectivamente. Este procedimiento permitió obtener las constantes de tiempo (τ) de activación y deactivación que se muestran en la **Tabla V.2**. Como se puede observar, la transfección con canales hERG p.T152HfsX180, tanto a 0.5 como 1 µg, aceleró y retrasó significativamente las cinéticas de activación y deactivación, respectivamente, de la I_{Kr} generada en células HL-1 ($P<0.05$) (**Tabla V.2**).

Además, y al igual que en la densidad de las corrientes de cierre, los cambios en la dependencia de tiempo de la I_{Kr} dependieron de la cantidad de ADNc transfectado, de tal manera que, a mayor cantidad de ADN, mayor efecto producido.

Células HL-1	I_{Kr}				
	τ_{act} (ms)	V_{hact} (mV)	k_{act}	τ_{fdeact} (ms)	τ_{sdeact} (ms)
hERG p.T152HfsX180 (-)	378±61	-15.7±2.2	8.6±1.0	70±9	430±49
hERG p.T152HfsX180 (0.5 µg)	222±36*	-16.9±2.7	9.2±1.3	112±14*	632±86*
hERG p.T152HfsX180 (1 µg)	205±35*	-15.5±4.1	7.5±0.8	162±26*	771±98*

Tabla V.2. Parámetros de la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Kr} registrada en células HL-1 transfectadas o no con hERG p.T152HfsX180. τ_{act} , constante de tiempo de la cinética de activación; V_{hact} y k_{act} , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación; τ_{fdeact} y τ_{sdeact} , constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*) de la cinética de deactivación. Cada valor representa la media±EEM de $n \geq 10$ experimentos/células. * $P < 0.05$ frente a células HL-1 sin transfectar [hERG p.T152HfsX180 (-)].

Los resultados obtenidos en células HL-1 confirmaron, por tanto, que los canales hERG p.T152HfsX180 ejercen un *efecto chaperona* sobre los canales hERG WT aumentando la expresión de éstos a nivel de la membrana plasmática.

3.3. Efecto de la mutación hERG p.T152HfsX180 sobre las características del PA ventricular humano

A continuación, tratamos de predecir qué morfología tendrían los PAs ventriculares de los pacientes portadores en heterocigosis de la mutación hERG p.T152HfsX180 y compararla con la de los sujetos portadores de los dos alelos WT. Con este fin se realizó una simulación *in silico* empleando el modelo matemático de Grandi-Bers (Grandi y cols., 2010) que previamente ha sido validado y utilizado con fines similares (Amoros y cols., 2011; Gonzalez de la Fuente y cols., 2013). Inicialmente se corrieron los modelos matemáticos que simulan los potenciales endocárdicos y epicárdicos humanos en situación “control” (con las características de la I_{Kr} generada por canales hERG WT) y después incluyendo todas aquellas modificaciones sobre la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Kr} producidas por la presencia conjunta de ambas formas de los canales hERG (WT + p.T152HfsX180). Se ensayaron además cuatro frecuencias de estimulación (0.1, 1, 2, y 3 Hz). En la parte superior del **panel A** de la **Figura V.16** se representa la densidad de la I_{Kr} generada durante el PA por los canales WT o en presencia del alelo mutado. Como puede apreciarse, la densidad de la I_{Kr} aumenta progresivamente durante el desarrollo del PA, alcanza un pico máximo coincidiendo con el inicio de la fase 3 de repolarización y luego disminuye hasta anularse de forma rápida. El modelo demuestra que el pico máximo de la I_{Kr} generada los canales hERG WT + hERG p.T152HfsX180 aparece un poco antes y es discretamente mayor que el de la generada por canales

WT. En la parte inferior del **panel A** de la **Figura V.16** se muestran dos PAs endocárdicos superpuestos generados a una frecuencia de estimulación de 0.1 Hz en situación “control” y considerando la presencia de la mutación p.T152HfsX180 en heterocigosis. Como se puede observar, la morfología de ambos PAs es prácticamente indistinguible si bien, la DPA generado por los canales WT + p.T152HfsX180 es un 3% más breve.

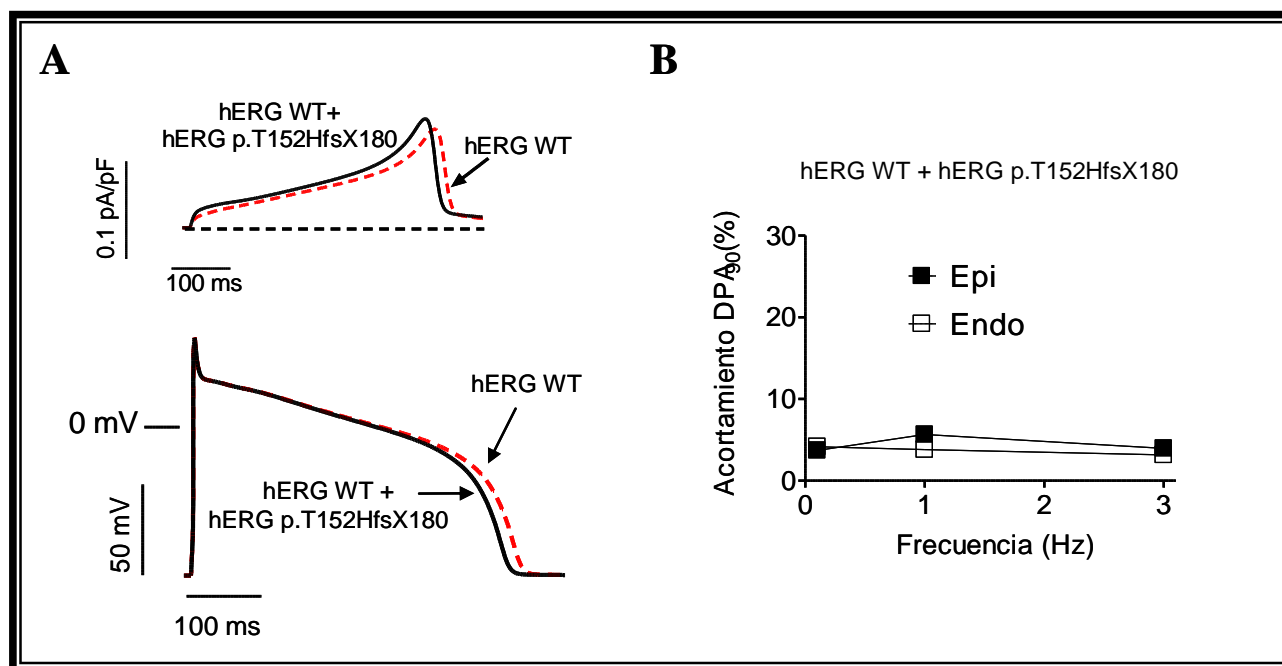


Figura V.16. Simulación *in silico* del PA ventricular humano incluyendo las modificaciones sobre la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Kr} producidas por la presencia, en heterocigosis, del mutante hERG p.T152HfsX180 generada utilizando el modelo matemático de Grandi-Bers. (A) Trazos de la I_{Kr} (parte superior) y PAs (parte inferior) obtenidos a 0.1 Hz y simulados a partir del modelo matemático en células ventriculares de origen endocárdico. (B) Porcentaje de acortamiento de la DPA_{90} en PAs simulados en presencia conjunta de ambas formas de los canales hERG (WT + p.T152HfsX180) a frecuencias comprendidas entre 0.1 y 3 Hz en células epicárdicas y endocárdicas.

Como se ha mencionado, se simularon también PAs endocárdicos y epicárdicos en la presencia de hERG WT + hERG p.T152HfsX180 y se representó el porcentaje de acortamiento en la DPA_{90} producido a diferentes frecuencias de estimulación comprendidas entre 0.1 y 3 Hz (**Figura V.16, panel B**). Como se puede observar el acortamiento en la DPA_{90} a todas las frecuencias analizadas era aproximadamente de un 3%.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos en el apartado 3, podemos confirmar que la presencia en heterocigosis de la mutación hERG p.T152HfsX180 por sí sola, no es responsable de la aparición de SQT en la familia de estudio.

4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN Tbx20 p.R311C

A continuación, tratamos de analizar si el factor de transcripción Tbx20 sería capaz de regular la expresión de aquellos canales iónicos cardíacos implicados en la fase de repolarización del PA ventricular humano, como sí lo hace en corazones adultos de otras especies como la mosca y el ratón (Qian y cols., 2008; Shen y cols., 2011). De esta manera, la mutación en Tbx20 (p.R311C) podría estar implicada en la aparición de SQTl en la familia estudiada. En primer lugar se buscaron las secuencias específicas de unión de Tbx20 en los promotores mínimos de aquellos genes que codifican las diferentes subunidades que forman los canales iónicos cardíacos responsables de la repolarización ventricular. Para ello, empleamos las bases de datos <https://epd.epfl.ch/index.php> y <https://switchgeargenomics.com/products/promoter-reporter-collection>, tanto en genoma humano como de ratón, tratando de localizar la secuencia consenso de unión a Tbx20 “AGGTGTGA” en aquellas regiones de los respectivos genes comprendidas, aproximadamente, entre los nucleótidos -800 a +200 en el caso del humano y -3000 a +200 en el caso del ratón, tomando de referencia como posición +1 la secuencia de inicio de transcripción.

Como se muestra en la **Tabla V.3**, identificamos varios genes cuyas regiones promotoras presentaban secuencias consenso de unión al factor. De hecho, uno de ellos fue el gen *KCNH2*, en el cual se reveló la existencia de un sitio de unión de Tbx20 tanto en el promotor del gen humano como de ratón (**Tabla V.3**). Decidimos, por tanto, realizar un análisis funcional de los efectos de Tbx20, tanto WT como p.R311C, sobre la I_{Kr} generada en células HL-1, cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC-CMs) y, desarrollamos de nuevo un modelo matemático *in silico*, con el fin de simular los posibles efectos producidos por la mutación en Tbx20 sobre las características del PA ventricular humano.

GEN	HUMANO		RATÓN	
	Referencia Transcrito	Posición secuencia consenso de unión a Tbx20	Referencia Transcrito	Posición secuencia consenso de unión a Tbx20
<i>ABCC9</i>	XM_005253288.2	NO	NM_021042	NO
<i>CACNA1C</i>	XM_011521022.1	NO	NM_009781	-1884
<i>CACNA1G</i>	NM_001256325.1	NO	NM_009783.3	NO
<i>CACNA1H</i>	NM_021098.2	NO	NM_021415.4	NO
<i>CACNA2D1</i>	NM_000722.3	NO	NM_009784	NO
<i>CACNB2</i>	NM_201590.2	NO	NM_023116	NO
<i>GATA4</i>	NM_002052.3	NO	NM_008092.3	NO
<i>GATA5</i>	NM_080473.4	NO	NM_008093.2	NO
<i>HCN1</i>	NM_021072.3	NO	NM_010408	NO
<i>HCN2</i>	NM_00194.3	NO	NM_008226	-2037
<i>HCN3</i>	NM_020897.2	NO	NM_008227.1	NO
<i>HCN4</i>	NM_005477.2	NO	NM_001081192	NO
<i>IRX1</i>	NM_024337.3	NO	NM_010573.2	NO
<i>IRX4</i>	NM_001278632.1	NO	NM_018885.2	NO
<i>IRX5</i>	NM_005853.5	NO	NM_018826.2	NO
<i>KCNE1</i>	NM_000219.5	-544	NM_008424.3	-865/-790
<i>KCNE2</i>	NM_172201.1	-467	NM_134110.3	NO
<i>KCNE3</i>	NM_005472.4	NO	NM_001190869.1	NO
<i>KCNH2</i>	NM_000238.3	+161	NM_013569.2	+88
<i>KCNJ11</i>	NM_001166290.1	-678	NM_001204411.1	NO
<i>KCNJ12</i>	NM_021012.4	NO	NM_010603.6	-2546
<i>KCNJ2</i>	NM_000891.2	NO	NM_008425	NO
<i>KCNJ3</i>	NM_002239.3	NO	NM_008426	NO
<i>KCNJ4</i>	NM_152868.2	NO	NM_008427.4	-1984
<i>KCNJ5</i>	NM_000890.3	NO	NM_010605.4	-2721
<i>KCNJ8</i>	NM_004982.3	-572	NM_008428	-783
<i>KCNN3</i>	NM_002249.5	-550	NM_080466.2	-1259
<i>KCNQ1</i>	NM_000218.2	NO	NM_008434	-1992/-2474
<i>MEF2C</i>	NM_001193350.1	NO	NM_001170537.1	NO
<i>NKX2.5</i>	NM_004387.3	NO	NM_008700.2	NO
<i>SCN1B</i>	NM_001037.4	NO	NM_011322	NO
<i>SCN2B</i>	NM_004588.4	-314	NM_001014761	-576
<i>SCN3B</i>	XM_011542897.1	NO	NM_178227	-496
<i>SCN4B</i>	NM_001142348.1	NO	NM_001013390	-2999/-1149
<i>SCN5A</i>	NM_001160161.1	NO	NM_021544.4	NO
<i>TBX5</i>	NM_181486.2	NO	NM_011537.3	NO
<i>TBX20</i>	NM_001077653.2	NO	NM_194263.2	NO

Tabla V.3. Identificación de secuencias consenso de unión a Tbx20 en los promotores mínimos de genes que codifican las diferentes subunidades que forman los canales iónicos así como diversos factores de transcripción que participan en la génesis del PA cardíaco. La búsqueda se realizó tanto en genoma humano como de ratón y empleando las bases de datos <https://epd.epfl.ch/index.php> y <https://switchgeargenomics.com/products/promoter-reporter-collection>. Se buscó la secuencia consenso de unión a Tbx20 “AGGTGTG” en aquellas regiones de los respectivos genes comprendidas, aproximadamente, entre los nucleótidos -800 a +200 en el caso del humano y -3000 a +200 en el caso del ratón, tomando de referencia como posición +1 la secuencia de inicio de transcripción. La referencia NM/XM de cada transcrito fue obtenida a partir de la base de datos RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). La región promotora del gen *KCNJ2* de rata (XM_006247567.2) no exhibe secuencia consenso de unión a Tbx20.

4.1. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la I_{Kr} generada en células HL-1. Estudio electrofisiológico

La I_{Kr} nativa fue registrada mediante la técnica de *patch-clamp* en células HL-1 transfectadas o no de manera transitoria con el ADNc que codifica Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g). La I_{Kr} fue medida como corriente sensible a dofetilida (1 μ M) en aquellas células HL-1 I_{Kr} -predominantes e intermedias. El porcentaje de células con estas características no resultó modificado por la transfección con Tbx20 (39% y 33% en presencia de WT y 39% y 28% en presencia de p.R311C, respectivamente). Asimismo, la transfección con los respectivos plásmidos no modificó en ningún caso la capacitancia celular (60.8 ± 7.2 pF con Tbx20 WT y 65.6 ± 9.4 pF con Tbx20 p.R311C) con respecto a las células HL-1 sin transfectar (55.2 ± 9.0 pF) ($P > 0.05$). Los registros se llevaron a cabo aplicando un protocolo de pulsos de 5 s en incrementos de 10 mV entre -80 y +60 mV desde un potencial de fijación de -80 mV. Las corrientes de cierre fueron obtenidas al repolarizar la membrana a -60 mV durante otros 5 s. Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron al valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente (pA/pF).

En la **Figura V.17** se muestra una familia representativa de trazos de la I_{Kr} generada en tres células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o mutado. Como se puede observar, la transfección con Tbx20 WT produjo un aumento de la amplitud de la corriente máxima y de las corrientes de cierre con respecto a células HL-1 sin transfectar. Sorprendentemente, Tbx20 p.R311C no sólo no aumentó, sino que disminuyó tanto la amplitud de la corriente máxima como la de las corrientes de cierre con respecto a células transfectadas o no con Tbx20 WT.

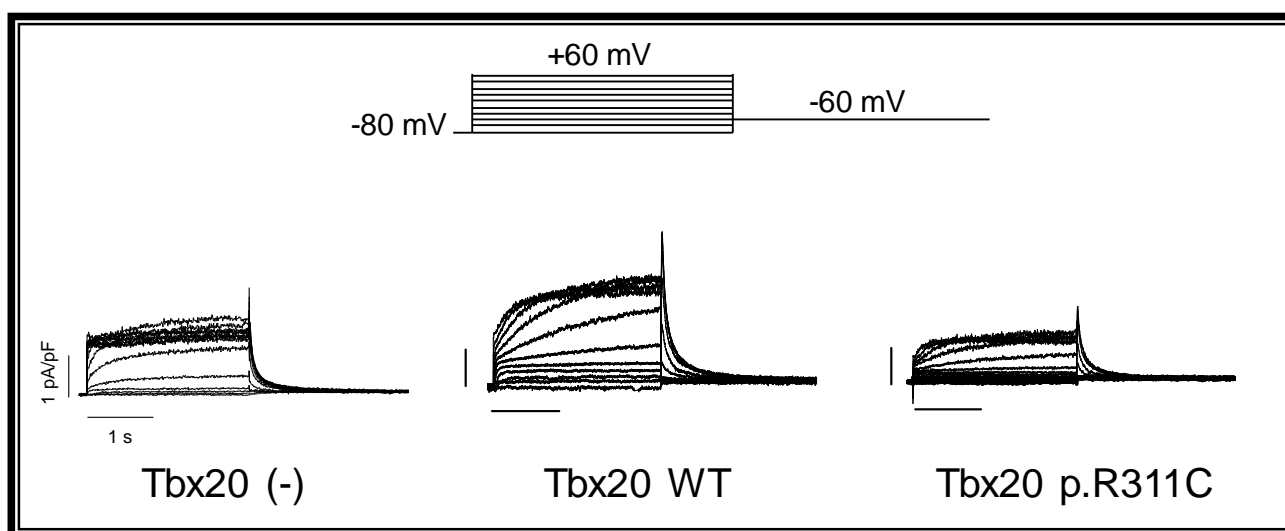


Figura V.17. Características electrofisiológicas de la I_{Kr} generada en células HL-1. Familias de trazos de la I_{Kr} registrada en tres células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g) tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior.

El análisis de las cinéticas de activación y deactivación se realizó a partir del ajuste de una función monoexponencial al trazo de corriente máxima generada a 0 mV y del ajuste de una función biexponencial al trazo de las corrientes de cierre generado tras aplicar un pulso a +60 mV, respectivamente. Este procedimiento permitió obtener las constantes de tiempo (τ) de activación y deactivación que se muestran en la **Tabla V.4**. Como se puede observar, ninguna de las formas de Tbx20 (WT o mutado) modificó la dependencia de tiempo de la activación ni la de la deactivación de la I_{Kr} generada en las células HL-1 (**Tabla V.4**).

Células HL-1	I_{Kr}				
	τ_{act} (ms)	V_{hact} (mV)	k_{act}	τ_{fdeact} (ms)	τ_{sdeact} (ms)
Tbx20 (-)	518 \pm 77	-10.7 \pm 3.6	7.7 \pm 1.7	179 \pm 29	1168 \pm 169
Tbx20 WT	486 \pm 75	-12.2 \pm 3.8	7.8 \pm 0.7	150 \pm 19	1142 \pm 157
Tbx20 p.R311C	574 \pm 98	-9.2 \pm 1.8	9.2 \pm 1.2	177 \pm 20	1106 \pm 126

Tabla V.4. Parámetros de la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Kr} registrada en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g). τ_{act} , constante de tiempo de la cinética de activación; V_{hact} y k_{act} , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación; τ_{fdeact} y τ_{sdeact} , constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*) de la cinética de deactivación. Cada valor representa la media \pm EEM de $n \geq 11$ experimentos/células.

Asimismo, los registros de corriente nos permitieron representar las curvas densidad de corriente-voltaje (I-V) para cada grupo experimental. Estas curvas fueron obtenidas al medir la densidad de la I_{Kr} al final de cada pulso en función del potencial del pulso aplicado (**Figura V.18**). Como se puede apreciar, la I_{Kr} generada en células transfectadas con Tbx20 WT aumentó significativamente con respecto a las células HL-1 sin transfectar a potenciales comprendidos entre -20 y +20 mV ($P < 0.05$). Por el contrario, la transfección con Tbx20 p.R311C disminuyó la densidad de corriente con respecto a células sin transfectar o transfectadas con Tbx20 WT, siendo en este último caso significativamente menor a potenciales de 0 y +10 mV (**Figura V.18**) ($P < 0.05$).

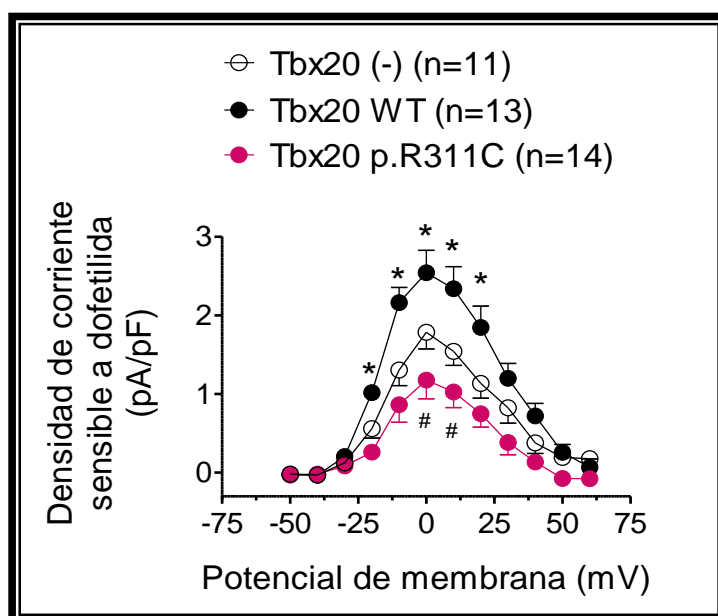


Figura V.18. Relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la I_{Kr} registrada como corriente sensible a dofetilida en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. Cada curva fue obtenida al representar la densidad de la corriente medida al final del pulso en función del potencial del pulso aplicado. Cada punto representa la media ± EEM de “n” experimentos/células. * $P < 0.05$ frente a células sin transfectar [Tbx20 (-)] y # $P < 0.05$ frente a Tbx20 WT.

En el **panel A** de la **Figura V.19** se muestran las curvas de activación de la I_{Kr} obtenidas al representar la densidad de las corrientes de cierre frente al potencial de membrana del pulso previo. El ajuste de una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el punto medio (V_{hact}) y la pendiente (k_{act}) para cada experimento (**Tabla V.4**). Como puede observarse, Tbx20 WT aumentó de forma significativa la densidad de las corrientes de cierre generadas tras aplicar pulsos comprendidos entre -10 y +60 mV con respecto a células HL-1 sin transfectar ($P < 0.05$). En cambio, Tbx20 p.R311C fue incapaz de aumentar la densidad de las corrientes de cierre. Es más, dicha densidad no solo no aumentó sino que disminuyó con respecto a la generada en células sin transfectar o transfectadas con Tbx20 WT. En este último caso además dicha disminución fue significativa a potenciales de membrana positivos (**Figura V.19 panel A**) ($P < 0.05$). En el **panel B**

de la misma figura se muestran igualmente las curvas de activación pero representando la densidad de las corrientes de cierre normalizada en cada caso al valor máximo de corriente en función del potencial de membrana del pulso previo. Como puede apreciarse, ni Tbx20 WT ni mutado modificaron la dependencia de voltaje de la activación de la I_{Kr} (**Figura V.19 y Tabla V.4**) ($P > 0.05$). De hecho, en la **Figura V.19B** se muestran las curvas de activación registradas en presencia y en ausencia de Tbx20 WT y p.R311C normalizadas a la amplitud máxima y, como puede observarse, éstas se superponen casi completamente lo que demuestra que presentan valores no diferentes de V_{hact} k_{act} (**Tabla V.4**).

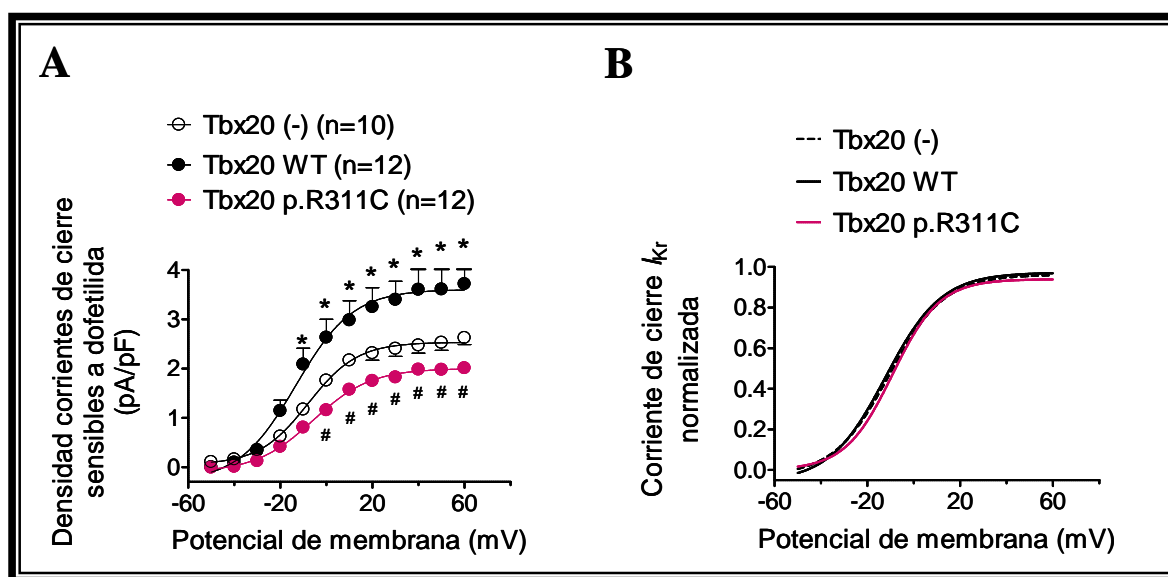


Figura V.19. Dependencia de voltaje de la activación de la I_{Kr} generada en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. (A) Curvas de activación obtenidas al representar la densidad de las corrientes de cierre en función del potencial de membrana del pulso previo. (B) Curvas de activación normalizadas al valor máximo de corriente en función del potencial de membrana del pulso previo. Tanto en A como en B, el ajuste mediante una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el V_{hact} y la k_{act} de cada curva. Cada punto representa la media \pm EEM de “n” experimentos/células. * $P < 0.05$ frente a células sin transfectar [Tbx20 (-)] y # $P < 0.05$ frente a Tbx20 WT.

4.2. Efecto de Tbx20 sobre los niveles de expresión de los canales hERG en células HL-1.

Ensayo de WB

Con el fin de determinar si los cambios observados en la I_{Kr} en presencia de Tbx20 son debidos a variaciones en los niveles de expresión de los canales hERG realizamos un análisis mediante WB en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g). En la **Figura V.20** se muestra la imagen representativa de WB (**panel A, izquierda**) donde se puede apreciar que aparecen dos bandas, una a un peso aproximado de 155 kDa, correspondiente a la forma totalmente glicosilada, y otra a 135 kDa, correspondiente a la forma parcialmente glicosilada, y por tanto más inmadura, de los canales hERG (ambas son indicadas con flechas,

respectivamente). Para confirmar que dichas bandas correspondían con las subunidades hERG, empleamos un quinto carril del WB para incubar una muestra de células HL-1 sin transfectar con el respectivo Ac primario anti-hERG más el péptido antigénico utilizado como control. Este péptido es capaz de unirse al Ac utilizado, impidiendo que éste se una de manera específica a los canales hERG. De este modo, aquella o aquellas bandas que no aparezcan en este carril control pero sí en el resto de los carriles del WB, corresponderán con hERG.

Como se muestra en la imagen de WB, las bandas correspondientes a hERG son más intensas en células transfectadas con Tbx20 WT (carril 3) pero no en aquellas transfectadas con Tbx20 p.R311C (carril 4), con respecto a la de las células sin transfectar (carril 2). En el **panel B** de la misma figura se representa el análisis densitométrico con la expresión de canales hERG normalizada a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis (**panel A, derecha**). Como se puede observar los resultados demuestran que Tbx20 WT aumentó, mientras que Tbx20 p.R311C disminuyó de forma significativa la expresión de canales hERG en células HL-1 (**Figura V.20, panel B**) ($P < 0.05$ en ambos casos).

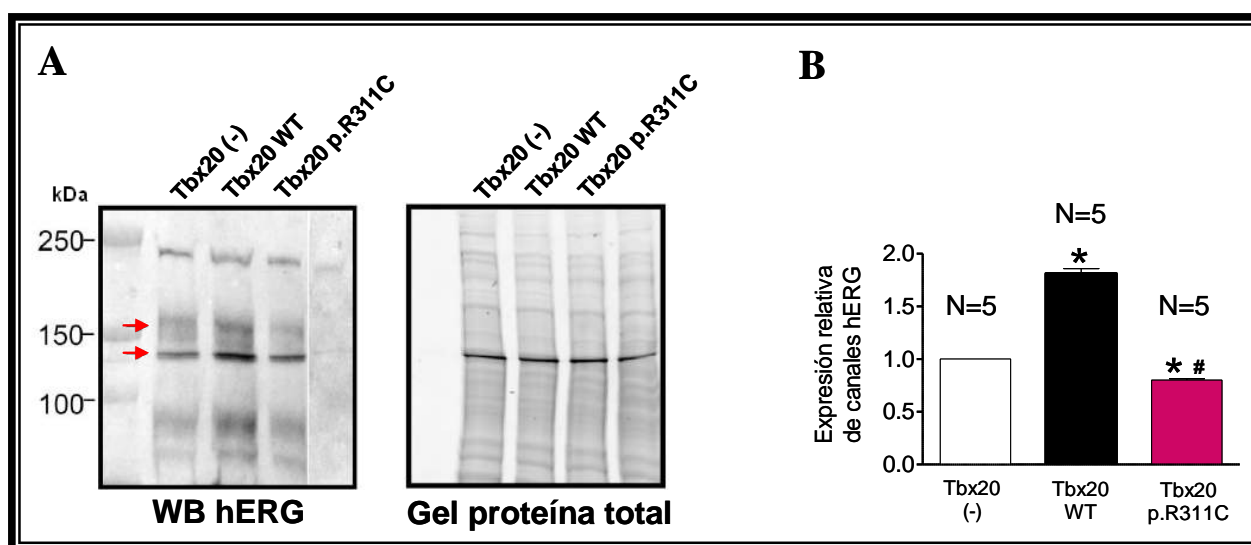


Figura V.20. Western blot (WB) para detectar la expresión de canales hERG en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o p.R311C. (A) Membrana de WB (izquierda) y gel de electroforesis con proteína total utilizado como control de carga (derecha). Las flechas rojas indican la presencia de subunidades hERG (una a 155 kDa correspondiente a la forma totalmente glicosilada y otra a 135 kDa, correspondiente a la forma parcialmente glicosilada, y por tanto más inmadura, de la proteína). La muestra del último carril de la derecha fue transferida a la membrana a partir del mismo gel pero, posteriormente, fue separada (línea continua) con el fin de incubarla con el respectivo anticuerpo primario más el péptido antigénico. El primer carril empezando por la izquierda corresponde con el patrón de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, 10-250 kDa). (B) Análisis densitométrico de las bandas de hERG normalizadas a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis. Los valores de “N” representan el número de experimentos/placas utilizados en cada grupo. * $P < 0.05$ frente a células sin transfectar [Tbx20 (-)] y # $P < 0.05$ frente a Tbx20 WT.

Como se ha mencionado en el apartado de Introducción, diversos estudios han sugerido que los canales que generan la I_{Kr} nativa en el miocardio adulto humano están formados por subunidades principales hERG asociadas a la subunidad auxiliar MiRP1, codificada por el gen *KCNE2* (Abbott y cols., 1999; Nerbonne, 2000). Por tanto, llevamos a cabo un segundo análisis de WB con el fin de identificar si Tbx20 sería capaz de regular los niveles de expresión de esta subunidad accesoria.

De nuevo, se utilizaron células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g). En la **Figura V.21** se muestra la imagen del WB (**panel A, izquierda**) en la que MiRP1 aparece con un peso aproximado de 25 kDa (indicado con una flecha), así como un gráfico de barras (**panel B**) en el que se detalla el análisis densitométrico de la expresión de dicha proteína normalizada a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis (**panel A, derecha**). Como se puede observar en ambos paneles, ni Tbx20 WT ni Tbx20 p.R311C fueron capaces de modificar los niveles de expresión de MiRP1 con respecto a células HL-1 sin transfectar ($P>0.05$).

Este resultado no es del todo sorprendente, ya que este ensayo fue realizado en células HL-1, cuyo origen es murino, y como se muestra en la tabla **Tabla V.3** en el promotor mínimo del gen *KCNE2* de ratón NO existe una secuencia consenso de unión a Tbx20 (sí existe en el ortólogo humano).

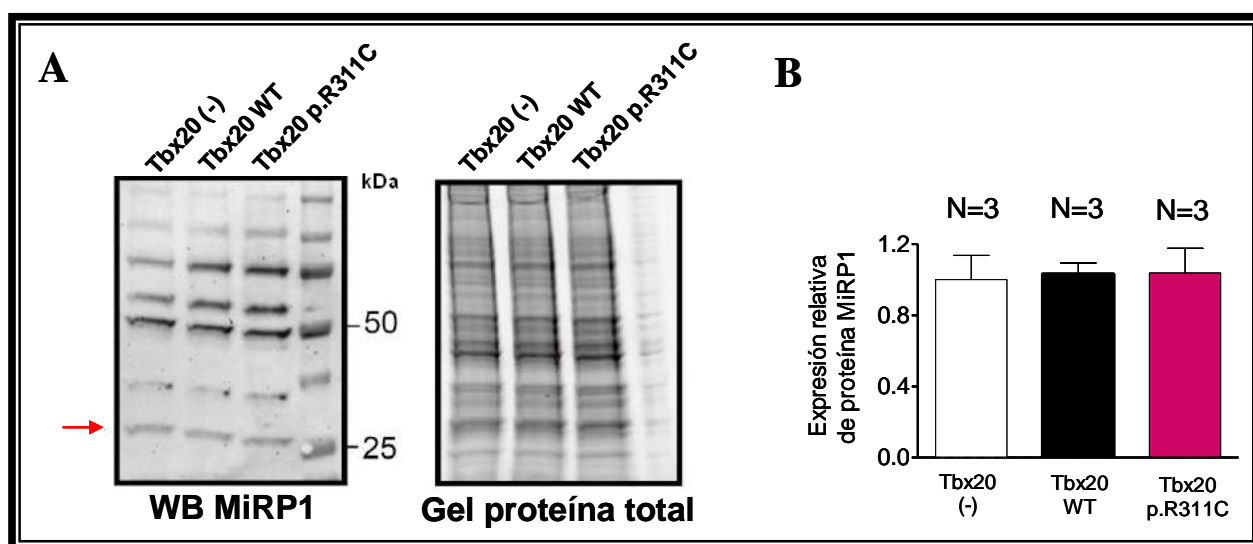


Figura V.21. Western blot (WB) para detectar la expresión de MiRP1 en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o p.R311C. (A) Membrana de WB (izquierda) y gel de electroforesis con proteína total utilizado como control de carga (derecha). La flecha roja indica la presencia de la proteína MiRP1 (alrededor de 25 kDa). El último carril de la derecha corresponde con el patrón de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, 10-250 kDa). (B) Análisis densitométrico de las bandas de MiRP1 obtenidas por WB y normalizadas a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis. Los valores de “N” representan el número de experimentos/placas utilizados en cada grupo.

4.3. Efecto del silenciamiento de Tbx20 sobre la I_{Kr} generada en células HL-1

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que Tbx20 ejerce un efecto pro-transcripcional sobre el gen *kcnh2* murino. A continuación, registramos la I_{Kr} en células HL-1 en las que el factor Tbx20 endógeno fue silenciado mediante la infección con partículas lentivirales portadoras de *shRNAs* diseñados específicamente para ello (ver secuencias en Materiales y Métodos). Como control, empleamos células HL-1 infectadas con lentivirus portando un *shRNA scrambled* el cual no presentaba ninguna secuencia complementaria a ningún ARNm endógeno celular. Todos los vectores además codificaban GFP que permitió identificar mediante microscopía de fluorescencia las células infectadas.

Previamente a la realización de los experimentos electrofisiológicos, se llevó a cabo un WB en células HL-1 infectadas durante 48 horas con los *shRNAs* para el silenciamiento de Tbx20 o con el *shRNA scrambled* (**Figura V.22**). Como se puede apreciar en la membrana del WB (**Figura V.22, panel A izquierda**), Tbx20 aparece como una banda con un peso aproximado de 55 kDa (indicado con una flecha). Se puede observar que, en aquellas células infectadas con los *shRNAs* (carril 3), la banda correspondiente al factor es mucho menos intensa que en la muestra de células control infectadas con el *shRNA scrambled* (carril 2). Efectivamente, al realizar el análisis densitométrico de las respectivas bandas (**Figura V.22, panel B**), normalizadas a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis (**panel A, derecha**), observamos que a las 48 horas post-infección, la expresión de Tbx20 en presencia de los *shRNAs* específicos para su silenciamiento disminuyó en un 58% con respecto a las células infectadas con el *shRNA scrambled* ($P<0.01$).

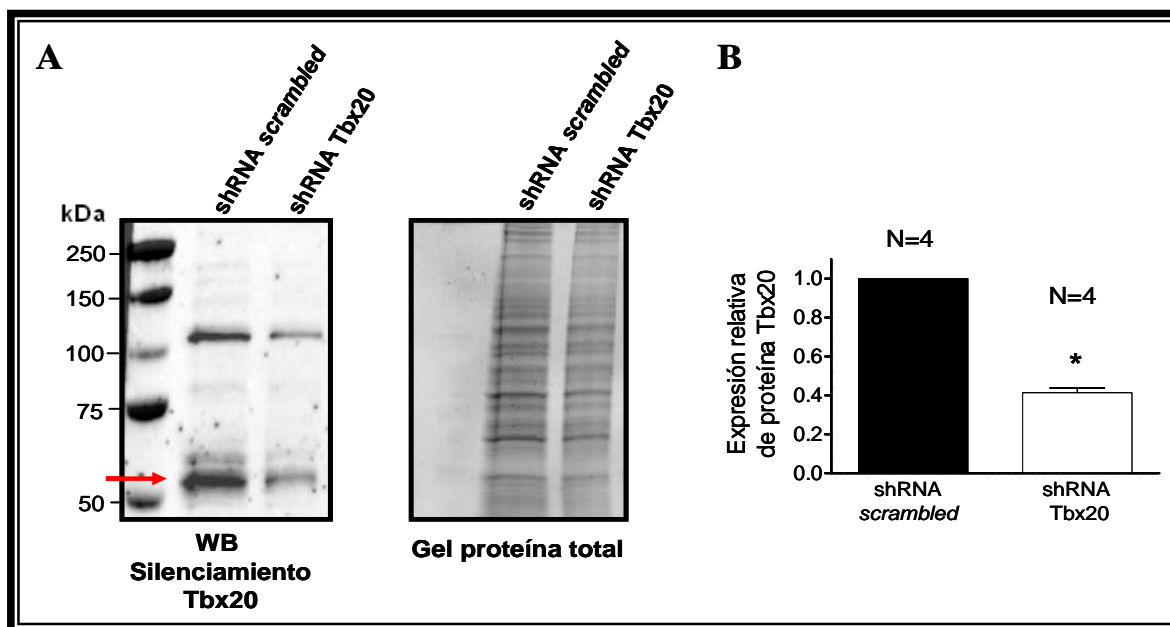


Figura V.22. Western blot (WB) demostrando el silenciamiento de Tbx20 en células HL-1. Las células fueron infectadas durante 48 horas con lentivirus portando *shRNAs* específicos para silenciar Tbx20 (carril 3) o un *shRNA scrambled* utilizado como control (carril 2). (A) Membrana de WB (izquierda) y gel de electroforesis con proteína total utilizado como control de carga (derecha). La flecha roja indica la presencia del factor Tbx20 (alrededor de 55 kDa). El primer carril corresponde con el patrón de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, 10-250 kDa). (B) Análisis densitométrico de las bandas de Tbx20 normalizadas a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis. Los valores de “N” representan el número de experimentos/placas utilizados en cada grupo. * $P < 0.01$ frente a células infectadas con *shRNA scrambled*.

Tras confirmar que los *shRNAs* silenciaban de manera específica la expresión de Tbx20, se llevó a cabo el correspondiente análisis electrofisiológico. En el **panel A** de la **Figura V.23** se muestra una familia representativa de trazos de la I_{K_r} generada en dos células HL-1 infectadas con lentivirus portando el *shRNA scrambled* o los *shRNAs* para silenciar Tbx20. Los registros se llevaron a cabo mediante la técnica de *patch-clamp* en aquellas células HL-1 I_{K_r} -predominantes aplicando un protocolo de pulsos de 5 s en incrementos de 10 mV entre -80 y +60 mV desde un potencial de fijación de -40 mV. Las corrientes de cierre fueron obtenidas al repolarizar la membrana a -60 mV durante otros 5 s. Como se puede observar en este panel, tanto la amplitud de la corriente como las corrientes de cierre disminuyeron en ~ 75% en aquellas células en las que Tbx20 fue silenciado. Es más, como se muestra en las curvas de activación representadas a partir de la densidad de las corrientes de cierre en función del potencial de membrana del pulso previo (**Figura V.23, panel B**), el silenciamiento de Tbx20 disminuyó significativamente la densidad de las corrientes de cierre registradas tras aplicar pulsos entre -20 y +60 mV ($P < 0.05$).

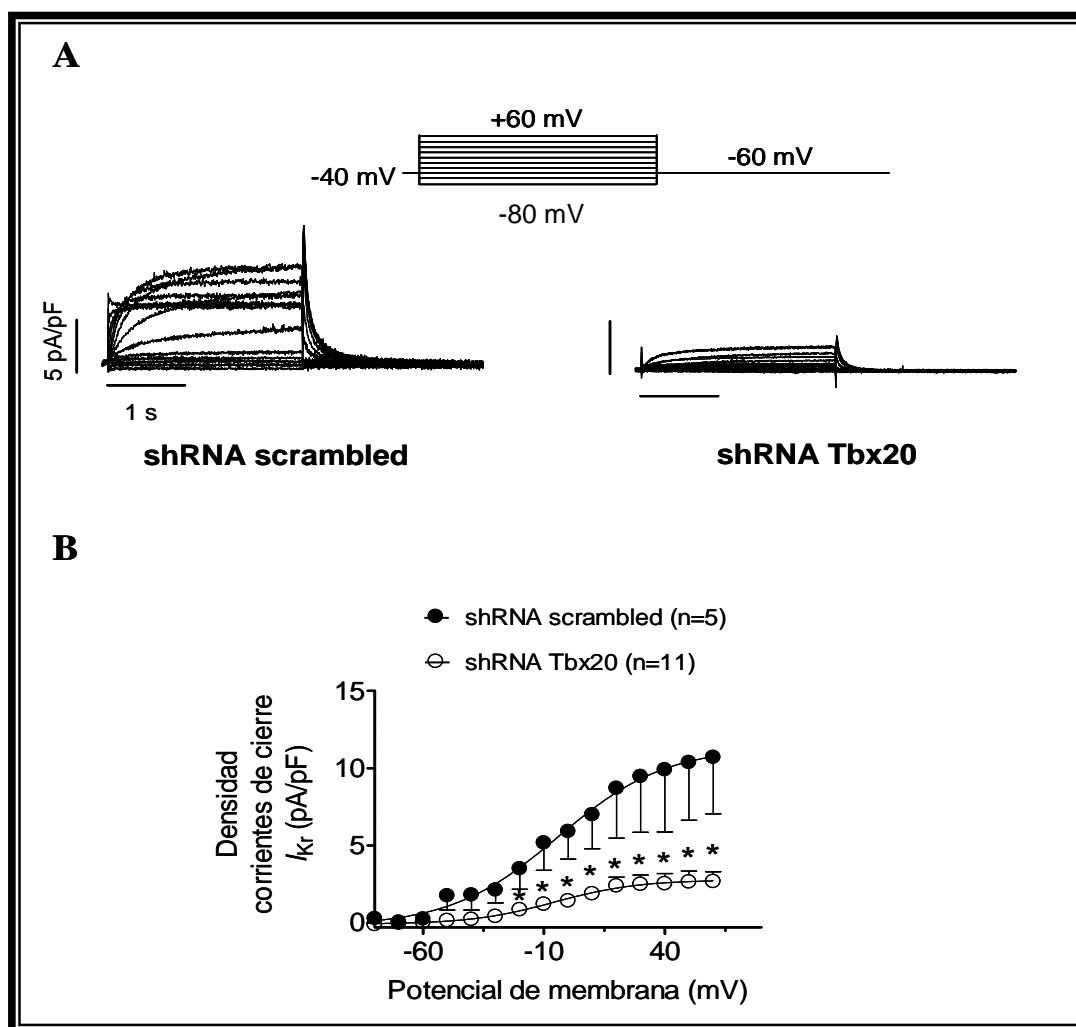


Figura V.23. Efecto del silenciamiento de Tbx20 sobre la I_{Kr} en células HL-1. Las células fueron infectadas durante 48 horas con lentivirus portando *shRNAs* específicos para el silenciamiento de Tbx20 o un *shRNA scrambled* utilizado como control. **(A)** Familias de trazos de la I_{Kr} registradas en dos células HL-1 I_{Kr} -predominantes en las que se silenció o no la expresión de Tbx20. **(B)** Curvas de activación de la I_{Kr} representadas como la densidad de las corrientes de cierre en función del potencial de membrana del pulso previo. El ajuste mediante una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el V_{hact} y la k_{act} de cada curva. Los valores de “n” representan el número de células de cada grupo. * $P < 0.05$ frente a células infectadas con *shRNAs scrambled*.

El ajuste de una función de Boltzmann a los datos de cada curva de activación permitió obtener el punto medio (V_{hact}) y la pendiente (k_{act}) para cada experimento (**Tabla V.5**). Como se puede apreciar, el silenciamiento de Tbx20 no modificó la dependencia de voltaje de la I_{Kr} con respecto a las células infectadas con lentivirus portando *shRNA scrambled* ($P > 0.05$).

El análisis de las cinéticas de activación y deactivación se llevó a cabo ajustando una función monoexponencial a los trazos de corriente máxima generada a 0 mV y una función biexponencial a los trazos de las corrientes de cierre generados tras aplicar un pulso a +60 mV, respectivamente. Este procedimiento permitió obtener las constantes de tiempo (τ) de activación y deactivación que

se muestran en la **Tabla V.5**. El silenciamiento de Tbx20 no modificó la dependencia de tiempo de la I_{Kr} con respecto a las células infectadas con *shRNA scrambled* ($P>0.05$).

Células HL-1	I_{Kr}				
	τ_{act} (ms)	V_{hact} (mV)	k_{act}	τ_{fdeact} (ms)	τ_{sdeact} (ms)
<i>shRNA scrambled</i>	526±69	-9.5±3.8	8.1±3.9	163±32	1203±145
<i>shRNA Tbx20</i>	499±83	-9.0±2.9	7.9±1.6	178±29	1154±203

Tabla V.5. Parámetros de la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Kr} registrada en células HL-1 infectadas con lentivirus portando *shRNAs* específicos para el silenciamiento de Tbx20 o un *shRNA scrambled* utilizado como control. τ_{act} , constante de tiempo de la cinética de activación; V_{hact} y k_{act} , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación; τ_{fdeact} y τ_{sdeact} , constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*) de la cinética de deactivación. Cada valor representa la media±EEM de $n \geq 5$ experimentos/células.

Los resultados del silenciamiento sugieren, por tanto, que el factor de transcripción Tbx20 ejerce un efecto pro-transcripcional sobre el promotor del gen *kcnh2* de ratón.

A partir de aquí, nuestro siguiente objetivo fue averiguar si Tbx20 sería capaz de regular los niveles de expresión del gen *KCNH2* no sólo en ratón, sino también en el miocardio humano, con el fin de identificar el grado de implicación de la mutación Tbx20 p.R311C en la aparición de SQTl en la familia estudiada. Para ello, llevamos a cabo un abordaje experimental en el que incluimos un ensayo de detección de la actividad luciferasa bajo control del promotor del gen *KCNH2* humano, una simulación *in silico* empleando el modelo matemático Grandi-Bers del PA ventricular humano y un estudio electrofisiológico en hiPSC-CMs.

4.4. Efecto de Tbx20 sobre el gen *KCNH2* humano en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa

Con el fin de determinar si Tbx20, tanto WT como p.R311C, regula la transcripción del gen *KCNH2* humano, llevamos a cabo un ensayo de detección de la actividad luciferasa. Como se ha mencionado al inicio del apartado 4, la región promotora de este gen posee una secuencia específica de unión a Tbx20 (**Tabla V.3**).

El fundamento de este tipo de ensayo consiste en la utilización del gen de la luciferasa como gen reportero precedido por una región promotora de la cual se pretende describir su rendimiento o capacidad transcripcional de forma cuantitativa. De esa forma, el efecto producido por la unión del factor de transcripción al promotor regulará la transcripción del gen de la luciferasa y el efecto se cuantificará en función de la emisión de fotones (luz) a partir de la oxidación del sustrato luciferina.

La cantidad de luz emitida por la reacción oxidativa será directamente proporcional al grado de funcionalidad del promotor de estudio (Cevenini y cols., 2016). En nuestro caso, se procedió a realizar el ensayo en células HL-1 transfectadas transitoriamente con el vector de expresión del enzima luciferasa pLightSwitch_Prom portando el promotor mínimo del gen *KCNH2* humano. Además, las células fueron transfectadas con un vector vacío [Tbx20 (-)] utilizado como control o con el vector codificando Tbx20 WT o p.R311C. En estos ensayos, el factor de transcripción Sp1 se utilizó como control positivo ya que, como ha sido descrito en el apartado de Introducción, el promotor del gen *KCNH2* posee diversas secuencias específicas de unión a dicho factor.

En la **Figura V.24** se muestra un gráfico de barras con los niveles de actividad luciferasa detectados, normalizados a la actividad luciferasa basal presente en las células control. Como se puede apreciar, el factor Sp1 y Tbx20 WT, pero no Tbx20 p.R311C, aumentaron de forma significativa los niveles de actividad del enzima en relación a las células control [Tbx20 (-)] ($P < 0.01$). Por tanto, Tbx20 WT, no su forma mutada, es capaz de ejercer un efecto pro-transcripcional sobre el promotor mínimo del gen *KCNH2* humano.

Con el fin de determinar si la mutación en Tbx20 afecta la unión del factor a la región promotora de *KCNH2*, realizamos de nuevo un ensayo de luciferasa pero esta vez cotransfectando las células HL-1 con Tbx20 WT + Tbx20 p.R311C en una relación 1:1 (**Figura V.24**). Sorprendentemente, cuando ambas formas del factor se expresan de manera conjunta, el efecto pro-transcripcional sobre *KCNH2* disminuye significativamente en relación al producido por Tbx20 WT ($P < 0.05$), pero aumenta de forma significativa con respecto a las células control ($P < 0.05$). Este resultado sugiere que Tbx20 p.R311C, al igual que la forma WT, va a ser capaz de unirse a la secuencia consenso del promotor del gen *KCNH2* humano. Es más, estos resultados sugieren que, cuando ambas formas están presentes al mismo tiempo, van a competir por su unión al promotor de manera que la ocupación del sitio de unión por una de ellas, impide que la otra se una, y viceversa.

Curiosamente, la transfección con Tbx20 p.R311C no disminuyó la actividad luciferasa basal con respecto a la registrada en condiciones control [Tbx20 (-)]. Este resultado puede deberse a que la sensibilidad de nuestro sistema es limitada.

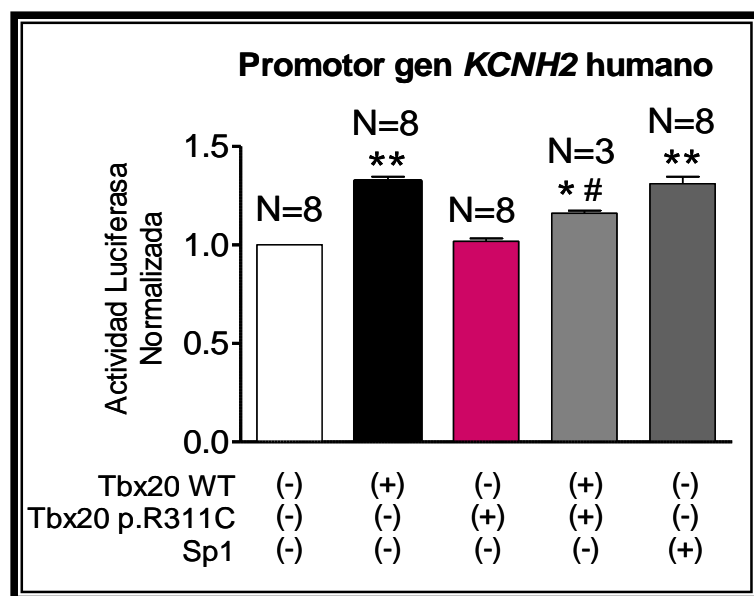


Figura V.24. Ensayo de detección de la actividad luciferasa en células HL-1. Las células fueron transfectadas con el vector de expresión del enzima luciferasa portando el promotor mínimo del gen humano *KCNH2*. Además, las células fueron transfectadas con un vector vacío [Tbx20 (-)], con el vector que codifica Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C, o cotransfectadas con Tbx20 WT + Tbx20 p.R311C. El factor de transcripción Sp1 se utilizó como control positivo en el ensayo. La actividad luciferasa obtenida se normalizó a la actividad luciferasa basal presente en las células control. Cada barra representa la media±EEM de “N” experimentos/placas. *P<0.05 frente a Tbx20 (-), **P<0.01 frente a Tbx20 (-) y #P<0.05 frente a Tbx20 WT.

4.5. Efecto de la mutación Tbx20 p.R311C sobre las características del PA ventricular humano

A continuación, quisimos predecir qué morfología tendrían los PAs ventriculares de los pacientes portadores de la mutación Tbx20 p.R311C en heterocigosis y compararla con la de los sujetos portadores de la forma WT. Con este fin se realizó, al igual que en el apartado 3.3, una simulación *in silico* empleando el modelo matemático de Grandi-Bers del PA ventricular endocárdico humano. Inicialmente, el modelo se simuló en situación “control” (con las características de la I_{Kr} generada en ausencia de Tbx20) y después incluyendo todas aquellas modificaciones sobre la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Kr} producidas por la sobreexpresión de Tbx20 WT o p.R311C. En todos los casos, los modelos fueron ensayados a una frecuencia de estimulación de 0.1 Hz. En la parte superior de la **Figura V.25**, se representa la densidad de la I_{Kr} generada durante el PA en la situación “control”, y en presencia del factor en su forma WT o mutada. Como puede apreciarse, la densidad de la I_{Kr} aumenta progresivamente durante el desarrollo del PA, alcanza un pico máximo coincidiendo con el inicio de la fase 3 de repolarización y luego disminuye hasta anularse de forma rápida. El modelo demuestra que el pico máximo de la I_{Kr} generada en presencia de Tbx20 WT aparece antes y es considerablemente mayor que el de la generada en la situación “control”. Por el contrario, en presencia de Tbx20 p.R311C el pico de corriente aparece más tarde y con una amplitud notoriamente menor que la generada en ausencia del factor. En la parte inferior de la **Figura V.25** se muestran tres PAs endocárdicos superpuestos generados a una frecuencia de estimulación de 0.1 Hz en situación “control” y considerando la presencia de Tbx20 WT o mutado. Como se puede observar, la presencia de Tbx20

WT acortó la DPA_{50} y la DPA_{90} como consecuencia del aumento de la amplitud de la I_{Kr} . Por el contrario, Tbx20 p.R311C prolongó la DPA_{50} y la DPA_{90} (en un 25% y un 23%, respectivamente, en relación a Tbx20 WT) debido a la disminución producida de la conductancia de la I_{Kr} (**Figura V.25, parte superior**).

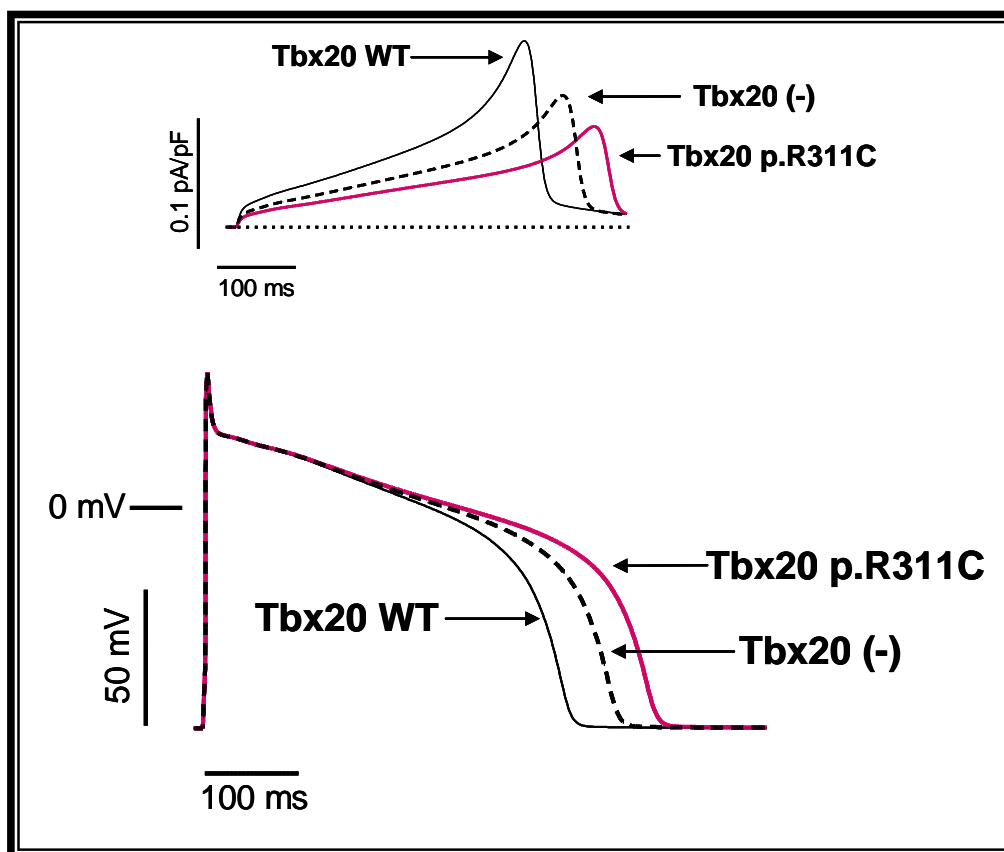


Figura V.25. Simulación *in silico* del modelo matemático de Grandi-Bers del PA ventricular endocárdico humano incluyendo las modificaciones sobre la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Kr} producidas por la presencia de Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. Trazos de la I_{Kr} (parte superior) y PAs (parte inferior) obtenidos a 0.1 Hz y simulados a partir del modelo matemático en células ventriculares de origen endocárdico.

Asimismo, con el fin de reproducir correctamente la condición genética del probando, llevamos a cabo una segunda simulación pero, esta vez, incluyendo todas aquellas modificaciones sobre la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Kr} producidas por la presencia conjunta de las mutaciones hERG p.T152HfsX180 y Tbx20 p.R311C, ambas en heterocigosis. En este caso, nuestra condición “control” se simuló a partir de las características de la I_{Kr} generada en presencia únicamente de la mutación en hERG.

En la parte superior del **panel A** de la **Figura V.26** se representa la densidad de la I_{Kr} generada durante el PA por los canales mutantes solos o en presencia de Tbx20 p.R311C. De nuevo, la densidad de la I_{Kr} aumenta progresivamente durante el desarrollo del PA, alcanza un pico máximo coincidiendo con el inicio de la fase 3 de repolarización y luego disminuye hasta anularse de forma rápida. El modelo demuestra que el pico máximo de la I_{Kr} generada por los canales hERG p.T152HfsX180 en presencia de Tbx20 mutado aparece después y es notablemente menor que el generado por la condición “control”. En la parte inferior del **panel A** de esta misma figura, se muestran superpuestos dos PAs endocárdicos generados a una frecuencia de estimulación de 0.1 Hz considerando la presencia de la mutaciones hERG p.T152HfsX180 en ausencia y presencia de Tbx20 p.R311C, ambas en heterocigosis. Como se puede observar, Tbx20 p.R311C prolongó la DPA en presencia del canal hERG mutante, como consecuencia de la disminución producida en la I_{Kr} (**Figura V.26 panel A, parte superior**).

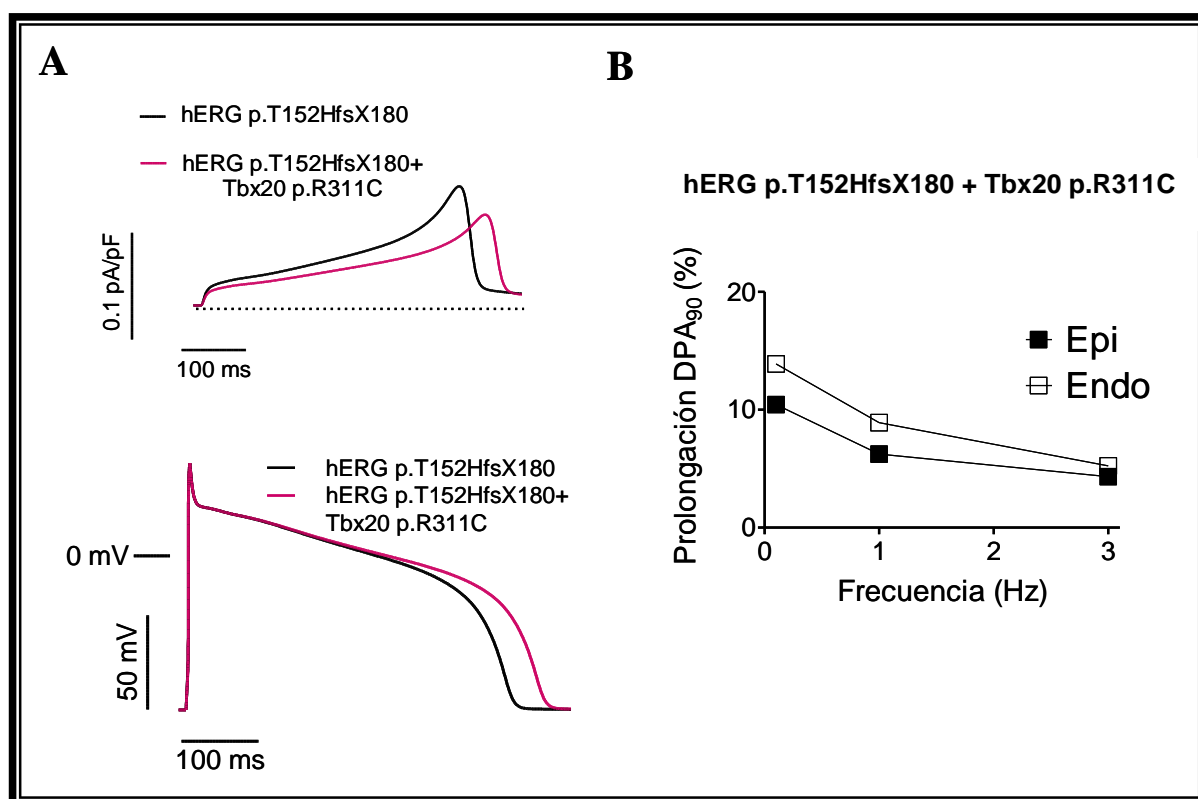


Figura V.26. Simulación *in silico* del PA ventricular humano incluyendo las modificaciones sobre la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Kr} producidas por la presencia de hERG p.T152HfsX180 + Tbx20 p.R311C generada mediante el modelo matemático de Grandi-Bers. (A) Registro de la I_{Kr} (parte superior) y PAs (parte inferior) simulados a 0.1 Hz en células de origen endocárdico. La situación “control” se simuló a partir de las características de la I_{Kr} generada en presencia únicamente de la mutación en hERG (B) Porcentaje de prolongación de la DPA₉₀ en PAs simulados por la presencia conjunta de las mutaciones en hERG y Tbx20 en células epicárdicas y endocárdicas a frecuencias de estimulación de 0.1, 1 y 3 Hz.

Asimismo, se simularon también PAs endocárdico y epicárdico generados por los canales mutados p.T152HfsX180 (en heterocigosis) y en presencia de Tbx20 p.R311C y se representó el porcentaje de prolongación en la DPA₉₀ producido a tres frecuencias de estimulación (0.1, 1 y 3 Hz) (**Figura V.26, panel B**). Como se puede observar, la prolongación de la DPA₉₀ fue mayor en células endocárdicas que epicárdicas y, en ambos casos, el efecto fue más marcado a frecuencias lentas de estimulación que a rápidas.

4.6. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la I_{Kr} y PAs generados en hiPSC-CMs

Una vez determinado el efecto de Tbx20, tanto WT como p.R311C, sobre la I_{Kr} generada en células HL-1 y sobre las características del PA ventricular humano simulado a partir del modelo matemático, tratamos de extrapolar los resultados obtenidos a un modelo fisiológicamente más relevante. La utilización de ratones modificados genéticamente no pudo ser una opción ya que los corazones de ratones adultos no generan I_{Kr} (Nerbonne, 2000). Además, y por razones éticas, en este momento no podemos disponer de miocitos ventriculares humanos procedentes de corazones de individuos sanos. En consecuencia, el efecto de Tbx20 fue analizado en hiPSC-CMs (*cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells*). Actualmente, las hiPSC-CMs representan uno de los modelos más utilizados para el estudio de las corrientes iónicas implicadas en el desarrollo del PA cardíaco humano (Hoekstra y cols., 2012; Karakikes y cols., 2015; Altomare y cols., 2016; Casini y cols., 2017; Perez-Hernandez y cols., 2018; Wei y cols., 2018).

Las hiPSC-CMs fueron diferenciadas y maduras aplicando un protocolo optimizado para la obtención de células con un fenotipo semejante al que muestran los cardiomiocitos ventriculares humanos (Herron y cols., 2016; Perez-Hernandez y cols., 2018). Una vez los hiPSC-CMs habían sido madurados, procedimos a su infección durante 48 horas con lentivirus portando vectores específicos para la expresión de Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. Dichos vectores, además, codificaban GFP, lo que permitía identificar mediante microscopía de fluorescencia las células infectadas.

La I_{Kr} nativa fue registrada como corriente sensible a dofetilida (1 μ M) aplicando un protocolo de pulsos de 5 s en incrementos de 10 mV desde un potencial de fijación de -60 mV a potenciales entre -40 y +60 mV. Las corrientes de cierre fueron obtenidas al repolarizar la membrana a -60 mV durante otros 5 s. Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron al valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente.

En la **Figura V.27** se muestran trazos de las corrientes de cierre de la I_{Kr} nativa registrada en un hiPSC-CM sin infectar (**panel A**) así como las curvas de activación de la I_{Kr} registrada en hiPSC-CMs infectados o no con los constructos lentivirales codificando Tbx20 WT o mutado

(panel B). Dichas curvas fueron obtenidas al representar la densidad de las corrientes de cierre en función del potencial de membrana del pulso previo. El ajuste de una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el punto medio (V_{hact}) y la pendiente (k_{act}) para cada experimento (Tabla V.6).

Como se puede observar, en aquellas células infectadas con Tbx20 WT, la densidad de las corrientes de cierre aumentó de forma significativa con respecto a las células control sin infectar [Tbx20 (-)] a potenciales entre +10 y +60 mV ($P<0.05$). Por el contrario, Tbx20 p.R311C disminuyó significativamente la densidad de las corrientes de cierre a potenciales entre +20 y +60 mV en relación a las células sin infectar o infectadas con Tbx20 WT (en este caso la disminución fue de aproximadamente un 60%) ($P<0.05$ en ambos casos).

Ni Tbx20 WT ni Tbx20 p.R311C modificaron la dependencia de voltaje de la activación de la I_{Kr} (Tabla V.6).

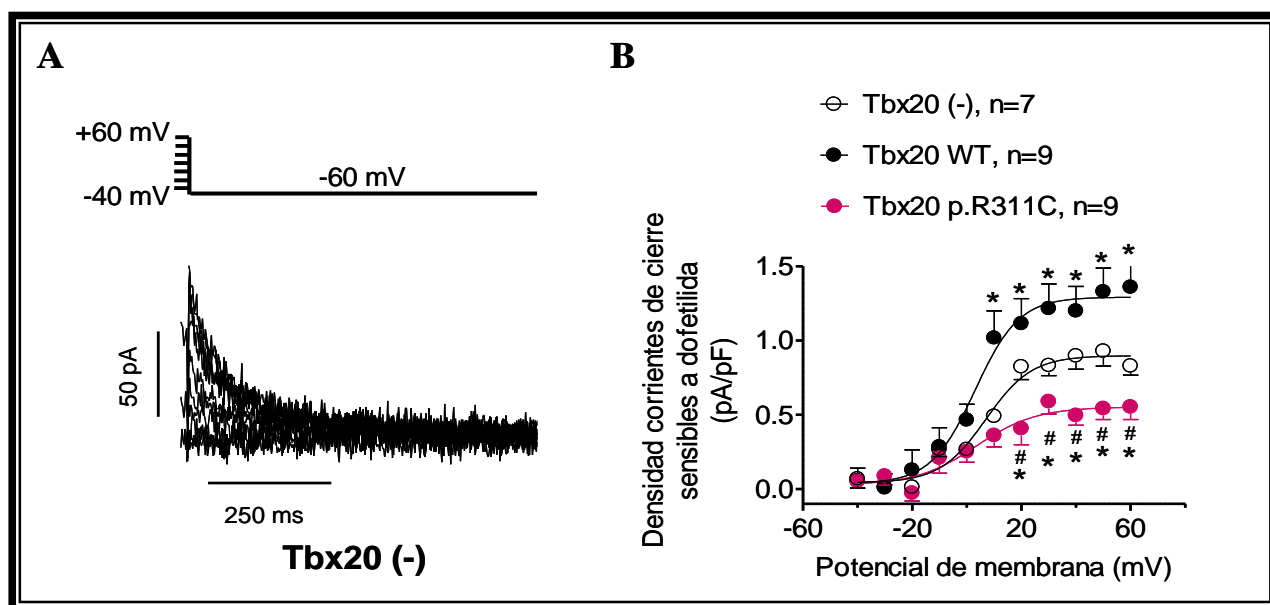


Figura V.27. Trazos de las corrientes de cierre (A) y curvas de activación (B) de la I_{Kr} registrada como corriente sensible a dofetilida en hiPSC-CMs infectadas o no con lentivirus portando Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. En (A) se muestran las corrientes de cierre generadas en un hiPSC-CMs sin infectar [Tbx20 (-)] al aplicar el protocolo mostrado en la parte superior del panel. En (B) las curvas de activación fueron obtenidas al representar la densidad de las corrientes de cierre en función del potencial de membrana del pulso previo. El ajuste mediante una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el V_{hact} y la k_{act} para cada curva. Cada punto representa la media \pm EEM de “n” experimentos/células. * $P<0.05$ frente a Tbx20 (-) y # $P<0.05$ frente a Tbx20 WT.

El análisis de la cinética de deactivación se realizó a partir del ajuste de una función monoexponencial a los trazos de las corrientes de cierre generados tras aplicar pulsos a +60 mV, obteniendo con ello la respectiva constante de tiempo (τ_{deact}) que se muestra en la **Tabla V.6**. Como se puede observar, ni Tbx20 WT ni p.R311C modificaron la cinética de deactivación de la I_{Kr} generada en hiPSC-CMs.

hiPSC-CMs	I_{Kr}		
	V_{hact} (mV)	k_{act}	τ_{deact} (ms)
Tbx20 (-)	2.4±1.9	7.2±3.6	357±80
Tbx20 WT	4.5±2.0	7.4±1.6	280±47
Tbx20 p.R311C	1.7±2.5	7.5±0.6	398±86

Tabla V.6. Parámetros de la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Kr} registrada en hiPSC-CMs infectadas o no con lentivirus portando vectores que codifican Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. V_{hact} y k_{act} , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación; τ_{deact} , constante de tiempo de la cinética de deactivación. Cada valor representa la media±EEM de $n \geq 7$ experimentos/células.

A continuación, analizamos el efecto de la mutación Tbx20 p.R311C sobre las características de los PAs registrados en hiPSC-CMs en células estimuladas a la frecuencia de 1 Hz (Herron y cols., 2016).

Las hiPSC-CMs son células que, a pesar de ser sometidas al correspondiente protocolo de maduración durante su crecimiento y diferenciación presentan un fenotipo inmaduro caracterizado por la baja expresión de canales Kir2.1 encargados de generar la corriente de potasio con rectificación interna (I_{K1}) (Meijer van Putten y cols., 2015; Verkerk y cols., 2017). Debido a ello, las hiPSC-CMs presentan un potencial de reposo significativamente más despolarizado que contribuye a que dichas células presenten actividad automática (Veerman y cols., 2015; Verkerk y cols., 2017).

En el **panel A** de la **Figura V.28** se muestran tres trazos superpuestos de PAs registrados a 1 Hz en hiPSC-CMs infectadas o no con los constructos lentivirales codificando Tbx20 WT o p.R311C. Como se puede apreciar, la infección con Tbx20 WT acortó, mientras que Tbx20 p.R311C prolongó de forma muy marcada la DPA_{50} y la DPA_{90} con respecto a las células sin infectar. Es más, si observamos el gráfico de barras en el que se representa la DPA_{90} de los tres grupos de células (**Figura V.28, panel B**) podemos observar que Tbx20 WT produjo un acortamiento significativo de la DPA_{90} ($P < 0.05$) mientras que Tbx20 p.R311C prolongó significativamente la DPA_{90} ($P < 0.05$ en ambos casos). No obstante, ninguna de las formas de Tbx20 modificó ni el PDM ni la APA con respecto a las células sin infectar (en el caso de la infección con Tbx20 WT dichos valores fueron de -68.4 ± 1.9 y 98.7 ± 14.2 mV, respectivamente).

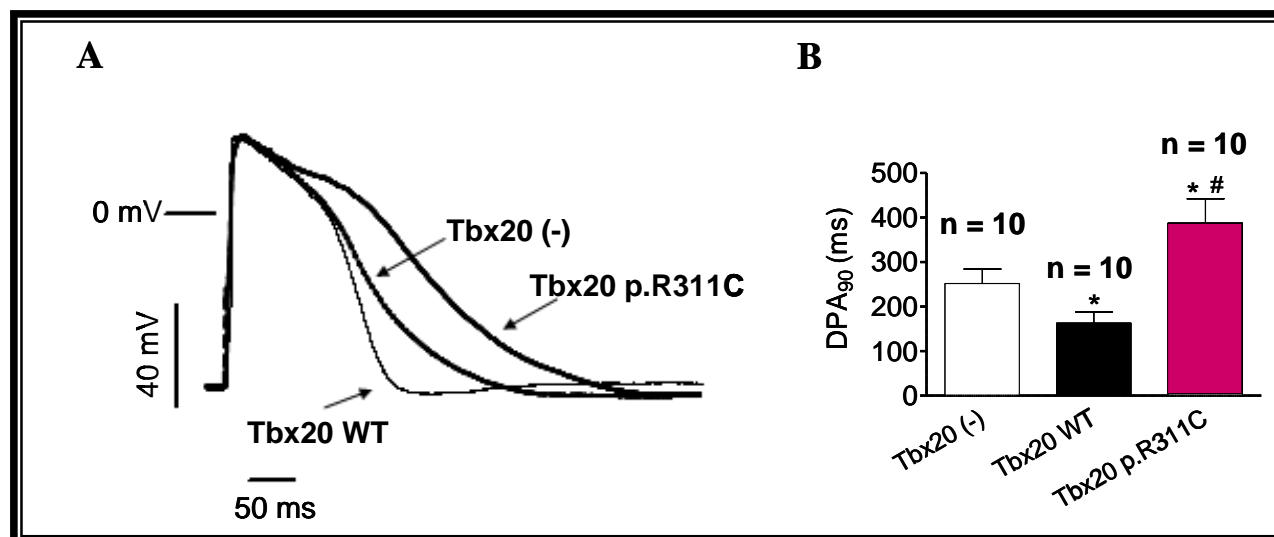


Figura V.28. Características de los PAs registrados en hiPSC-CMs infectadas o no con lentivirus portando Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. (A) Trazos superpuestos de PAs registrados a 1 Hz en tres hiPSC-CMs infectadas o no con Tbx20 WT o p.R311C. (B) Valores de la DPA₉₀ obtenidos en los PAs registrados en cada grupo experimental. Cada barra representa la media±EEM de “n” experimentos/células. *P<0.05 frente a Tbx20 (-) y #P<0.05 frente a Tbx20 WT.

En estas condiciones, se registraron también PAs a diferentes frecuencias de estimulación (0.1, 1 y 2 Hz) y se midió la DPA₉₀ en cada caso (**Figura V.29**). De nuevo, Tbx20 p.R311C prolongó significativamente la DPA₉₀ a todas las frecuencias analizadas (P<0.05 frente a Tbx20 WT), observándose un efecto más pronunciado a frecuencias lentas (158% de prolongación a 0.1 Hz) que a rápidas (102% a 2 Hz) (**Figura V.29**).

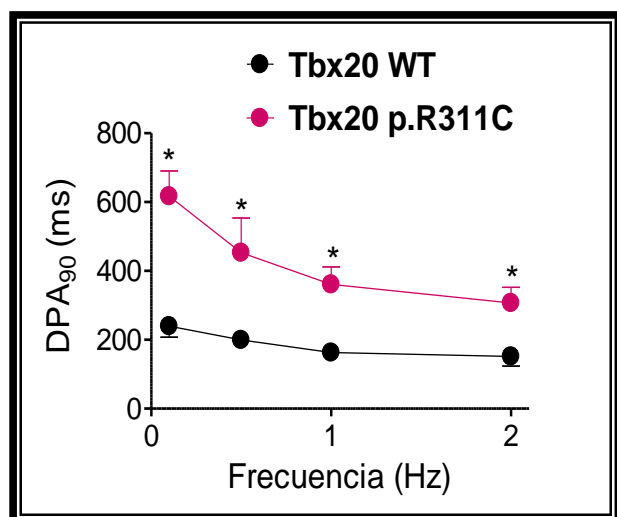


Figura V.29. Representación de la DPA₉₀ en PAs conducidos a diferentes frecuencias de estimulación en hiPSC-CMs infectadas con Tbx20 WT o p.R311C. Los PAs fueron registrados a frecuencias de 0.1, 1 y 2 Hz. *P<0.05 frente a Tbx20 WT.

Por tanto, los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que el factor de transcripción Tbx20 es capaz de regular la expresión de los canales hERG. En concreto, tanto en células HL-1 como hiPSC-CMs, Tbx20 WT y Tbx20 p.R311C son capaces de unirse a la región promotora del gen *KCNH2*. Sin embargo, y a diferencia de Tbx20 WT, el mutante Tbx20 p.R311C carece de actividad

pro-transcripcional sobre dicho gen, lo que conlleva a una disminución en los niveles de expresión de los canales hERG y de la I_{Kr} generada por éstos. Asimismo, como hemos podido observar en las diferentes simulaciones del PA ventricular humano y en los PAs registrados en hiPSC-CMs en presencia o ausencia de Tbx20 (WT y mutado), la disminución de la I_{Kr} producida por Tbx20 p.R311C da lugar a un retraso de la repolarización de los PAs con la consiguiente prolongación de la DPA. Por todo ello, se confirma que la mutación Tbx20 p.R311C podría ser responsable del SQTl de la familia objeto de estudio.

5. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL EFECTO DE Tbx20 SOBRE OTROS CANALES IÓNICOS CARDIACOS

Además de analizar el efecto de Tbx20 sobre la I_{Kr} , tratamos de analizar los efectos producidos por dicho factor, tanto WT como p.R311C, sobre el resto de corrientes iónicas cardiacas implicadas en la repolarización del PA ventricular humano. Concretamente, nos centramos en analizar la I_{Ks} , I_{K1} , I_{Na} e $I_{Ca,L}$, ya que han sido descritos numerosos mutantes en los canales que generan dichas corrientes como responsables del desarrollo de diferentes tipos de SQTl (Tester y Ackerman, 2014; Nakano y Shimizu, 2016).

5.1. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la I_{Ks}

Como se ha descrito en el apartado de Introducción, los canales que generan el componente lento de la corriente de salida de K^+ con rectificación tardía (I_{Ks}) en el miocardio ventricular humano, están formados por el ensamblaje de cuatro subunidades α Kv7.1 (codificadas por el gen *KCNQ1*) junto con dos subunidades auxiliares minK (codificadas por el gen *KCNE1*). Muchas de las mutaciones identificadas en ambas subunidades han sido asociadas con la aparición de SQTl, en concreto, de los tipos 1 (SQTl1) y 5 (SQTl5), respectivamente (Duggal y cols., 1998; Bianchi y cols., 1999; Schmitt y cols., 2000; Splawski y cols., 2000). Por este motivo, nos planteamos si Tbx20 podría estar regulando la expresión de los canales Kv7.1 + minK y, si así fuera, cuáles serían las características electrofisiológicas de la I_{Ks} generada en presencia de la mutación Tbx20 p.R311C.

Como se muestra en la **Tabla V.3**, Tbx20 posee dos sitios de unión específicos dentro del promotor del gen *Kcnq1* de ratón, lejos de la secuencia de inicio de la transcripción (posiciones -2474 y -1992), pero no presenta ninguno en la región promotora del gen humano. En el caso de la

proteína minK, sin embargo, en la región promotora del gen *KCNE1* en ambas especies si existen secuencias de unión para Tbx20.

5.1.1. Efecto de Tbx20 sobre la I_{Ks} generada en células HL-1. Estudio electrofisiológico

La I_{Ks} fue registrada en células HL-1 transfectadas o no con el ADNc que codifica Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g). Los registros se realizaron mediante la técnica de *patch-clamp* aplicando un protocolo de pulsos de 5 s de duración en incrementos de 10 mV entre -80 y +60 mV, desde un potencial de fijación de -80 mV. Las corrientes de cierre fueron obtenidas al repolarizar la membrana a -30 mV durante otros 5 s (Caballero y cols., 2003; Amorós y cols., 2011). Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron al valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente (pA/pF).

Como se ha mencionado en el apartado 3.2, en aproximadamente un 27% de las células HL-1 la principal corriente repolarizante de salida de K^+ es la I_{Ks} (células I_{Ks} predominantes) mientras que otro 36% presentaba tanto I_{Kr} como I_{Ks} (células intermedias) (el 37% restante corresponde a células HL-1 cuya principal corriente repolarizante es la I_{Kr}). En consecuencia, la I_{Ks} fue registrada en células HL-1 I_{Ks} -predominantes e intermedias y fue medida como “corriente resistente a dofetilida” (1 μ M) al no quedar inhibida por acción de dicho fármaco y sí por el agente bloqueante selectivo de canales Kv7.1, HMR-1556 (1 μ M) (Tamargo y cols., 2004).

El porcentaje de células HL-1 I_{Ks} -predominantes e intermedias no resultó modificado por la transfección con Tbx20 (28% y 33% en presencia de Tbx20 WT y Tbx20 p.R311C, respectivamente).

En el **panel A** de la **Figura V.30** se muestra una familia representativa de trazos de la I_{Ks} generada en células HL-1 transfectadas con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. Como puede apreciarse, la amplitud de la I_{Ks} generada en presencia de Tbx20 WT fue muy similar a aquella generada en presencia del factor mutado. De hecho, en el **panel B** de la misma figura se muestran las relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) obtenidas al representar la densidad de la corriente medida al final del pulso en función del potencial del pulso aplicado. Efectivamente, ninguna de las formas de Tbx20, ni WT ni mutado, fue capaz de modificar la densidad de la I_{Ks} a ninguno de los potenciales, con respecto a las células sin transfectar ($P > 0.05$).

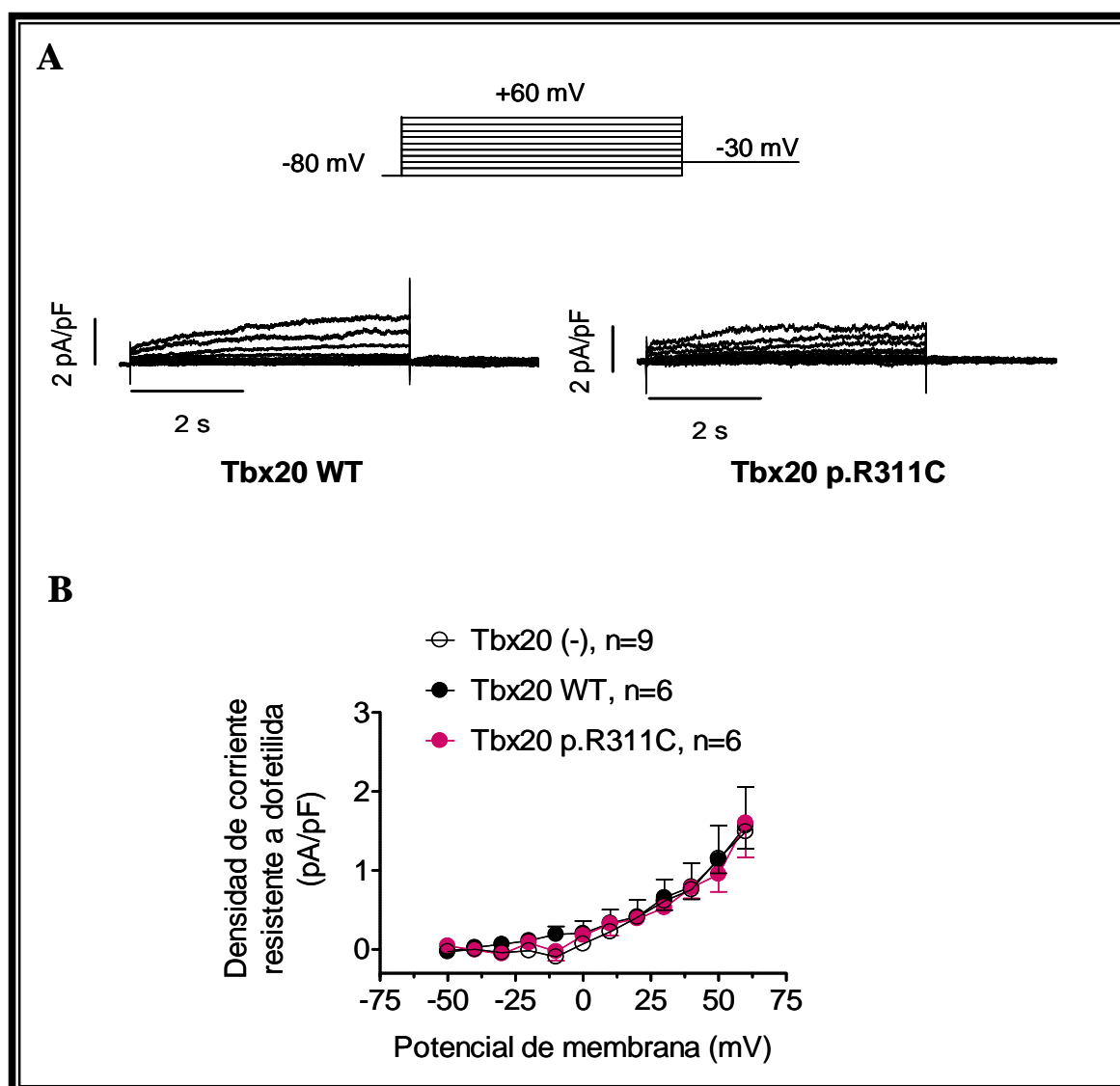


Figura V.30. Características electrofisiológicas de la I_{Ks} generada en células HL-1. (A) Familias de trazos de la I_{Ks} registrada como corriente resistente a dofetilida en dos células HL-1 transfectadas con Tbx20 WT o p.R311C tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior. (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje de la I_{Ks} obtenidas en células transfectadas o no con Tbx20 WT o mutado al representar la densidad de corriente medida al final del pulso en función del potencial del pulso aplicado. Cada punto representa la media \pm EEM de “n” experimentos/células de cada grupo.

Por otro lado, analizamos la dependencia de voltaje de la activación de la I_{Ks} construyendo las curvas conductancia-voltaje en función del potencial de membrana. El ajuste de una función de Boltzmann a los datos permitió obtener los valores del punto medio (V_h) y de la pendiente (k) para cada experimento (Tabla V.7). Como puede apreciarse, ni Tbx20 WT ni mutado modificaron la dependencia de voltaje de la activación de la I_{Ks} ($P>0.05$).

Células HL-1	I_{Ks}			
	τ_{act} (ms)	V_{hact} (mV)	k_{act}	τ_{deact} (ms)
Tbx20 (-)	1817±487	35.8±2.0	15.3±2.3	629±157
Tbx20 WT	1497±217	36.5±5.2	16.8±3.6	630±173
Tbx20 p.R311C	1558±404	36.8±5.5	18.4±3.4	467±131

Tabla V.7. Parámetros de la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Ks} registrada en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. τ_{act} , constante de tiempo de la cinética de activación; V_{hact} y k_{act} , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación; τ_{deact} , constante de tiempo de la cinética de deactivación. Cada valor representa la media±EEM de $n \geq 6$ experimentos/células.

El análisis del curso temporal de la activación y la deactivación de la I_{Ks} se llevó a cabo ajustando una función monoexponencial tanto a los trazos de corriente máxima como a los trazos de las corrientes de cierre generados tras aplicar pulsos a +60 mV. Este procedimiento permitió obtener las constantes de tiempo (τ) de activación y deactivación que se muestran en la **Tabla V.7**. Como puede observarse, ni Tbx20 WT ni Tbx20 p.R311C modificaron las cinéticas de activación ni de deactivación de la I_{Ks} generada en células HL-1 ($P > 0.05$).

5.1.2. Efecto de Tbx20 sobre los niveles de expresión de los canales Kv7.1 en células HL-1.

Ensayo de WB

Una vez realizados los experimentos electrofisiológicos analizamos mediante WB si Tbx20 era capaz de regular los niveles de expresión de las subunidades Kv7.1 en células HL-1. Para ello, las células fueron transfectadas, o no, con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g). En la **Figura V.31** se muestra la imagen representativa de WB (**panel A, izquierda**) donde se puede apreciar que las subunidades Kv7.1 aparecen con un peso aproximado de 50 kDa (indicado con una flecha). Podemos observar que la intensidad de las bandas es prácticamente igual tanto en células sin transfectar (carril 1) como en las transfectadas con Tbx20 WT (carril 2) o mutado (carril 3). Efectivamente, en el gráfico de barras (**panel B**) donde se representa el análisis densitométrico de los niveles de expresión de Kv7.1 normalizados a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis (**panel A, derecha**), podemos apreciar que ninguna de las formas de Tbx20, ni WT ni p.R311C, es capaz de modificar la expresión de dichas subunidades ($P > 0.05$).

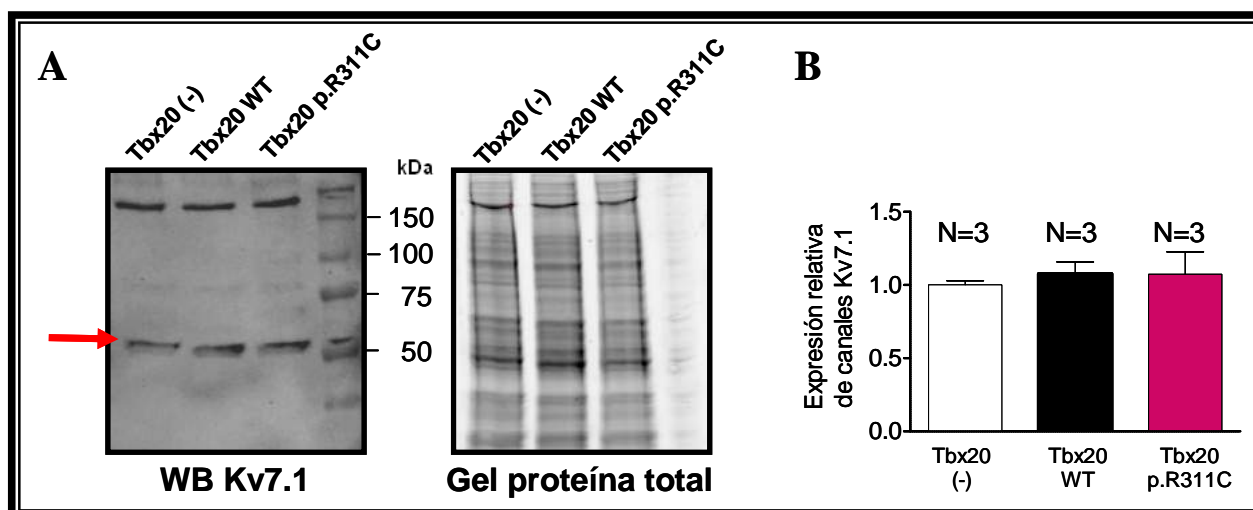


Figura V.31. Western blot (WB) para detectar los niveles de expresión de Kv7.1 en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. (A) Membrana de WB (**izquierda**) y gel de electroforesis mostrando la proteína total que fue utilizado como control de carga (**derecha**). La flecha roja ubicada indica la presencia de la proteína Kv7.1 (alrededor de 50 kDa). El último carril de la derecha corresponde con el patrón de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, 10-250 kDa). (B) Análisis densitométrico de las bandas de Kv7.1 obtenidas por WB y normalizadas a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis. Cada barra representa la media \pm EEM de “N” experimentos/placas utilizados en cada grupo.

Asimismo, realizamos un segundo WB para detectar los niveles de expresión de la subunidad auxiliar minK en presencia o ausencia de Tbx20 WT y p.R311C. El ensayo fue llevado a cabo de nuevo en células HL-1 bajo las mismas condiciones de transfección.

En la **Figura V.32** se muestra la imagen representativa de WB (**panel A, izquierda**) en la que minK aparece con un peso aproximado de entre 25 y 37 kDa (indicado con una flecha). Asimismo, podemos observar que las bandas correspondientes a dicha proteína son notablemente más intensas en presencia de Tbx20, tanto WT como mutado (carriles 2 y 3, respectivamente), que en las células sin transfectar (carril 1). Si observamos el **panel B** de la misma figura en el que se representa el correspondiente análisis densitométrico de los niveles de expresión de minK normalizados a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis (**panel A, derecha**), se confirma que Tbx20, tanto en su forma WT como mutada, aumenta significativamente la expresión de dicha proteína con respecto las células sin transfectar y que ambas formas de Tbx20 lo hacen de forma similar ($P < 0.05$).

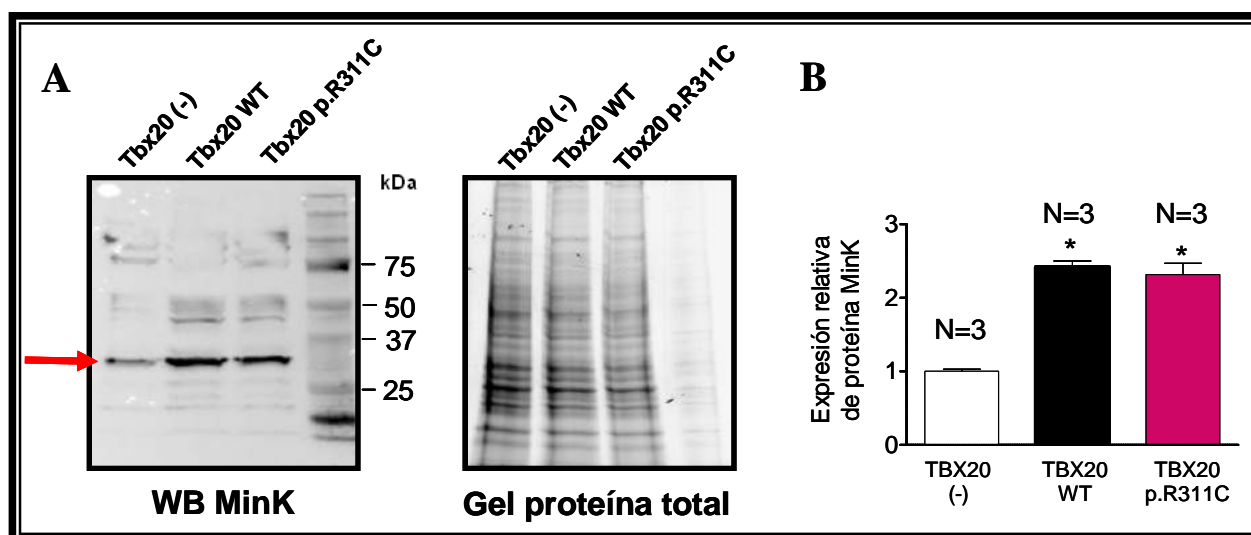


Figura V.32. Western blot (WB) para detectar la cantidad de proteína MinK en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. (A) Membrana de WB (izquierda) y gel de electroforesis mostrando la proteína total utilizado como control de carga (derecha). La flecha roja indica la presencia de la proteína MinK (entre 25 y 37 kDa). El último carril de la derecha corresponde con el patrón de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, 10-250 kDa). (B) Análisis densitométrico de las bandas de MinK obtenidas por WB y normalizadas a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis. Cada barra representa la media±EEM de “N” de experimentos/placas utilizados en cada grupo.

5.1.3. Efecto de Tbx20 sobre la transcripción de los genes *KCNQ1* y *KCNE1* humanos en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa

Con el fin de identificar si Tbx20 es capaz de controlar la transcripción sobre los promotores de los genes *KCNQ1* y *KCNE1* humanos, llevamos a cabo un ensayo de detección de la actividad luciferasa en células HL-1 transfectadas transitoriamente con los vectores de expresión del enzima luciferasa pLightSwitch_Prom portando, por separado, los promotores mínimos de ambos genes. Además, las células fueron transfectadas con un vector vacío [Tbx20 (-)] utilizado como control, o con el vector codificando Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C.

En el **panel A** de la **Figura V.33** se muestra la actividad luciferasa basal presente en las células transfectadas con el promotor mínimo humano del gen *KCNQ1* en ausencia de ningún factor de transcripción [Tbx20 (-)]. Como control positivo se utilizó de nuevo el factor de transcripción Sp1 para el cual dicho promotor humano presenta varias secuencias consenso de unión (Luo y cols., 2008). De hecho, la actividad luciferasa generada en presencia de Sp1 fue significativamente mayor que aquella presente en las células Tbx20 (-) ($P < 0.01$). Por otro lado, podemos observar que ni Tbx20 WT ni Tbx20 p.R311C produjeron un cambio significativo en la actividad luciferasa con respecto a las células [Tbx20 (-)] (**Figura V.33, panel A**) ($P > 0.05$).

En el **panel B** de la **Figura V.33** se muestra la actividad luciferasa obtenida en las mismas condiciones, pero en presencia del promotor del gen *KCNE1*. En este caso, ambas formas de Tbx20 (WT y mutado) fueron capaces de aumentar significativamente y de manera similar los niveles de actividad luciferasa con respecto a las células [Tbx20 (-)] ($P<0.05$).

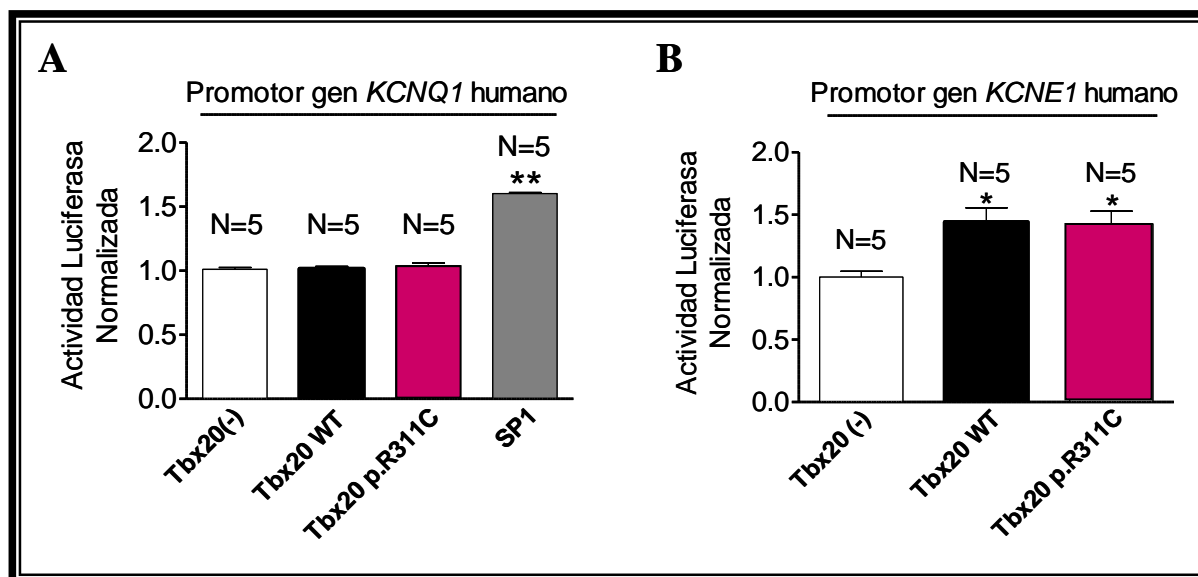


Figura V.33. Ensayo de detección de la actividad luciferasa en células HL-1. Las células fueron transfectadas con el vector de expresión del enzima luciferasa portando los promotores mínimos de los genes humanos *KCNQ1* (A) o *KCNE1* (B). Además, las células fueron transfectadas con un vector vacío [Tbx20 (-)], Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. En el caso del análisis en el gen *KCNQ1*, el factor de transcripción SP1 se utilizó como control positivo de la transcripción. La actividad luciferasa obtenida se normalizó a la actividad luciferasa basal presente en aquellas células [Tbx20 (-)]. En (A) y (B), cada barra representa la media ± EEM de “N” experimentos/placas de cada condición. * $P<0.05$ frente a Tbx20 (-) y ** $P<0.01$ frente a Tbx20 (-).

Podemos confirmar, por tanto, que Tbx20, tanto WT como p.R311C, es capaz de ejercer un efecto pro-transcripcional sobre el gen *KCNE1* humano, mientras que ninguna de las formas del factor es capaz de modular la expresión del gen *KCNQ1* humano. Estos resultados serían compatibles con los obtenidos en la **Tabla V.3** donde podemos observar que, efectivamente, en el promotor del gen *KCNE1* humano, pero no en el de *KCNQ1*, existe una secuencia consenso de unión a Tbx20. Por otro lado, estos resultados a su vez confirmarían los obtenidos en el WB, donde apreciamos que ambas formas de Tbx20 son capaces de aumentar la expresión de la proteína minK pero no la de las subunidades Kv7.1. Sin embargo, al compararlos con los obtenidos en el estudio electrofisiológico, podemos observar que el aumento en la expresión de la subunidad minK no correlaciona con un aumento sobre la I_{Ks} generada en las células HL-1.

En definitiva, podemos confirmar que los canales Kv7.1+minK, así como la corriente generada por ellos (I_{Ks}) no son regulados de forma diferencial por Tbx20 WT y p.R311C. Por tanto,

la aparición del SQTl en la familia objeto de estudio no se puede atribuir a los efectos producidos por p.R311C Tbx20 sobre la I_{Ks} .

5.2. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la I_{K1}

El gen *KCNJ2* codifica los canales cardiacos de potasio con rectificación interna Kir2.1. Éstos, junto con los canales Kir2.2 y Kir2.3, son los responsables de generar la I_{K1} en el miocardio adulto humano, a pesar de que son los canales Kir2.1 los principales responsables de generar dicha corriente a nivel ventricular (Gaborit y cols., 2007). Como se muestra en la **Tabla V.3**, ninguno de los promotores de los genes *KCNJ2*, ni el de humano ni el de ratón, poseen secuencias consenso de unión a Tbx20. No obstante, debido a la posible implicación de la I_{K1} en la aparición de SQTl (Tristani-Firouzi y Etheridge, 2010; Kukla y cols., 2014), decidimos analizar funcionalmente el efecto de Tbx20, tanto WT como p.R311C, sobre de dicha corriente.

5.2.1. Estudio electrofisiológico en células HL-1

La I_{K1} fue registrada en células HL-1 transfectadas o no de manera transitoria con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g). Los registros se llevaron a cabo empleando la técnica de *patch-clamp* aplicando un protocolo de pulsos de 2 s en incrementos de 10 mV entre -150 y 0 mV, desde un potencial de fijación a -30 mV. Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron al valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente (pA/pF).

En la **Figura V.34** se muestran las relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) para cada condición de transfección y obtenidas al representar la densidad de la corriente medida al final del pulso en función del potencial del pulso aplicado. Desgraciadamente, y como se puede observar en la figura, no conseguimos registrar la I_{K1} a ninguno de los potenciales ensayados. En lugar de ello, a potenciales comprendidos entre -150 y 0 mV, predominó la corriente marcapasos (I_f). Aun así, ninguna de las formas de Tbx20 (ni WT ni mutado) fue capaz de modificar la densidad de la I_f con respecto a la generada en las células HL-1 sin transfectar ($P > 0.05$). Este resultado sería compatible con el hecho de que en los promotores de los principales genes que codifican los canales que generan la I_f (*HCN1*, *HCN3* y *HCN4*), tanto en el miocardio de ratón como de humano, no existen secuencias de unión específicas para Tbx20 (**Tabla V.3**).

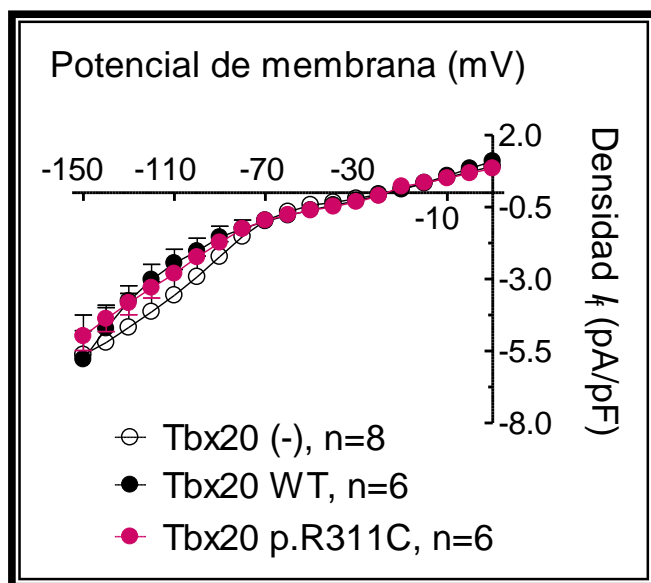


Figura V.34. Relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la I_f generada en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. Cada punto representa la media \pm EEM de “n” experimentos/células de cada grupo.

Por tanto, con el fin de analizar el efecto de Tbx20 sobre la I_{K1} utilizamos miocitos ventriculares de rata. Estudios previos han descrito que en la rata, al igual que sucede en el humano, los canales cardiacos Kir2.1 son los principales responsables de generar la I_{K1} a nivel ventricular (Nakamura y cols., 1998).

5.2.2. Efecto de Tbx20 sobre la I_{K1} generada en miocitos ventriculares de rata adulta. Estudio electrofisiológico

La I_{K1} fue registrada en miocitos ventriculares de rata adulta disociados enzimáticamente e infectados o no con partículas lentivirales portando vectores específicos para la expresión de Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C (Matamoros y cols., 2016; Perez-Hernandez y cols., 2018). Ambos vectores codificaban además GFP como control de la infección mediante visualización de la fluorescencia. En la **Figura V.35** se muestra una familia representativa de trazos (**panel A**) y las relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) (**panel B**) de la I_{K1} generada en miocitos ventriculares de rata infectados o no con las diferentes partículas lentivirales. La corriente se registró mediante la técnica de *patch-clamp* aplicando un protocolo de pulsos de 250 ms en incrementos de 10 mV (desde un potencial de fijación de -40 mV) a potenciales entre -100 y +40 mV. Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron al valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente (pA/pF).

Como se puede observar tanto en los trazos de corriente (**panel A**) como en las relaciones I-V (**panel B**), ni Tbx20 WT ni Tbx20 pR311C modificaron la I_{K1} a ninguno de los potenciales con respecto a miocitos control sin infectar (**Figura V.34**) ($P > 0.05$).

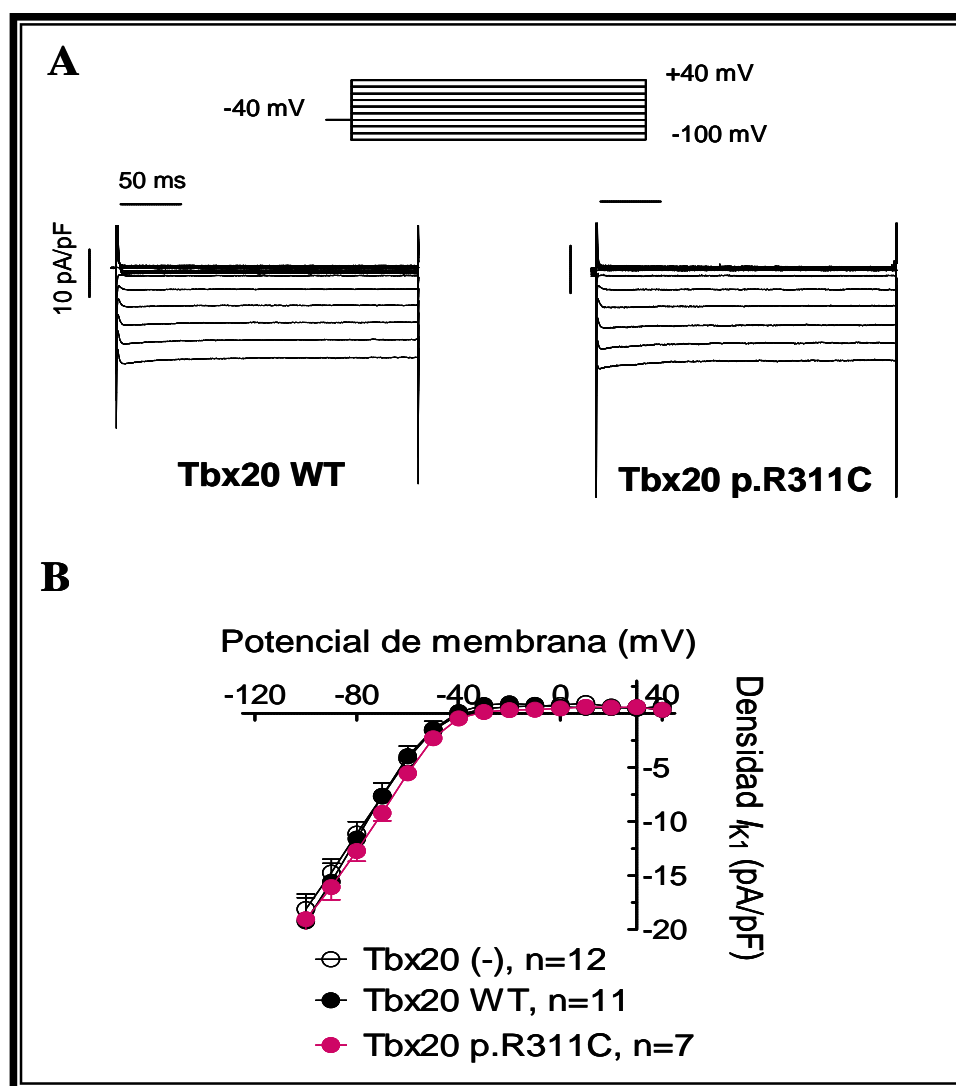


Figura V.35. Características electrofisiológicas de la I_{K1} registrada en miocitos ventriculares de rata adulta. (A) Familias de trazos de la I_{K1} registradas en dos cardiomiocitos ventriculares de rata infectados con constructos lentivirales que codificaban Tbx20 WT o p.R311C y obtenidos al aplicar el protocolo mostrado en la parte superior. (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la I_{K1} registrada en miocitos ventriculares de rata obtenidas al representar la densidad de la corriente medida al final de los pulsos en función del potencial del pulso aplicado. Cada punto representa la media \pm EEM de “n” células de cada grupo.

5.2.3. Efecto de Tbx20 sobre los niveles de expresión de los canales Kir2.1 en células HL-1.

Ensayo de WB

Con el fin de determinar si Tbx20 regula la expresión de los canales Kir2.1, se llevó a cabo un WB en células HL-1 transfectadas o no de manera transitoria con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g). En la **Figura V.36** se muestra la imagen representativa de WB (**panel A, izquierda**) en la que las subunidades Kir2.1 aparecen con un peso aproximado de 37 kDa (indicado con una flecha), así como un gráfico de barras (**panel B**) en el que se representa el análisis densitométrico con los niveles de expresión de Kir2.1 normalizados a la cantidad de proteína total

presente en cada carril del gel de electroforesis (**panel A, derecha**). Cabe destacar el hecho de que a pesar de que la I_{K1} no puede registrarse en células HL-1, éstas sí expresan canales Kir2.1. Como se puede observar en la imagen de la membrana, las bandas correspondientes a Kir2.1 presentan la misma intensidad tanto en ausencia de Tbx20 (carril 2) como en presencia de dicho factor, ya sea en su forma WT (carril 3) o mutada (carril 4). Es más, el análisis densitométrico (**Figura V.36, panel B**) confirma que ninguna de las formas de Tbx20 fue capaz de modificar los niveles de expresión de los canales Kir2.1 en relación a las células HL-1 sin transfectar ($P > 0.05$).

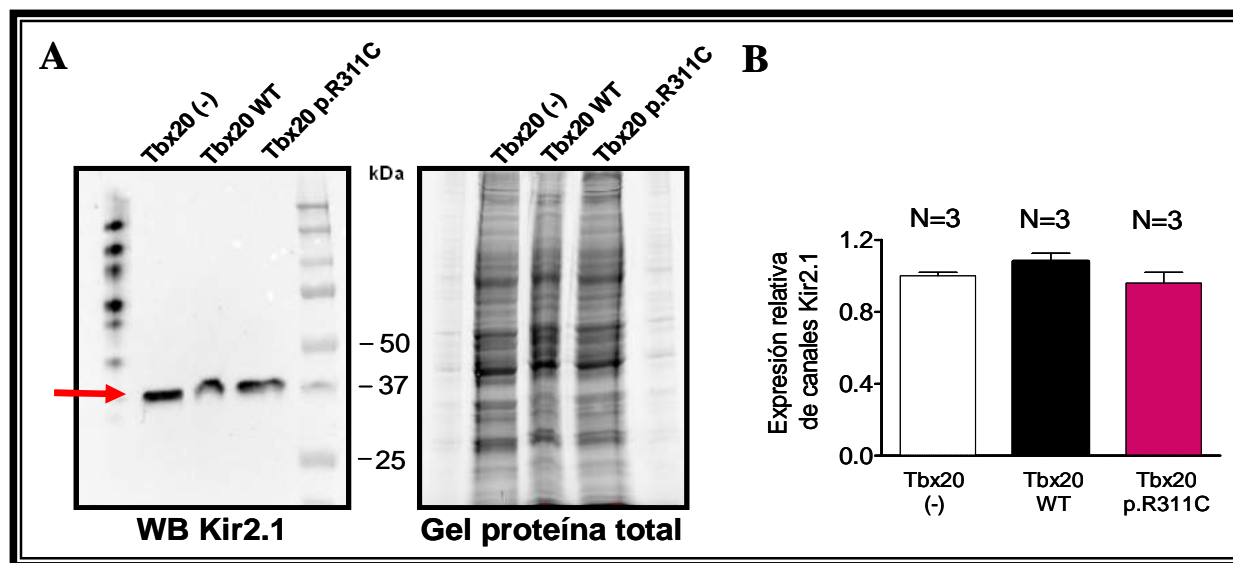


Figura V.36. Western blot (WB) para detectar la expresión de canales Kir2.1 en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. (A) Membrana de WB (izquierda) y gel de electroforesis con mostrando la proteína total que fue utilizado como control de carga (derecha). La flecha indica la presencia de Kir2.1 (37 kDa). El primer y el último carril de la membrana corresponden con el patrón de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, 10-250 kDa). (B) Análisis densitométrico de las bandas de Kir2.1 normalizadas a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis. Cada barra representa la media \pm EEM de “N” experimentos/placas utilizados en cada grupo.

Los resultados del apartado 5.2 confirman, por tanto, que ni Tbx20 WT ni Tbx20 p.R311C son capaces de regular la expresión de los canales Kir2.1 ni de la I_{K1} generada por éstos. Por tanto, la aparición del SQTL en la familia objeto de estudio no se puede atribuir a los efectos producidos por p.R311C Tbx20 sobre la I_{K1} .

5.3. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la I_{Na}

Los canales iónicos responsables de generar la corriente de sodio (I_{Na}) en el miocardio adulto humano están formados por el ensamblaje de una subunidad conductora formadora del poro (Nav1.5), codificada por el gen *SCN5A*, y una o varias subunidades accesorias β , codificadas por el gen *SCN2B* (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall y cols., 2005a; Catterall, 2012). Como se

muestra en la **Tabla V.3**, Tbx20 no posee sitios de unión específicos en la secuencia promotora del gen *SCN5A* ni en humano ni en ratón pero si en el promotor del gen *SCN2B* en ambas especies.

Diversas mutaciones tanto en el gen *SCN5A* como en otros que codifican proteínas accesorias a dichos canales (caveolina 3, la subunidad auxiliar Nav β 4 o la α 1-sintrofina), han sido asociadas con la aparición de diferentes tipos de SQT (SQT3, SQT9, SQT10 y SQT12, respectivamente) (Vatta y cols., 2006; Medeiros-Domingo y cols., 2007; Nakano y Shimizu, 2016). Por tanto, considerando la posible implicación de la I_{Na} en el desarrollo de SQT en la familia de estudio, llevamos a cabo un análisis del efecto de Tbx20 WT y p.R311C sobre las características electrofisiológicas de dicha corriente, así como un análisis del efecto producido sobre los niveles de expresión de los genes *SCN5A* y *SCN2B* humanos.

5.3.1. Efecto de Tbx20 sobre la I_{Na} generada en células HL-1. Estudio electrofisiológico

La I_{Na} fue registrada mediante la técnica de *patch-clamp* en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g), aplicando un protocolo de pulsos de 20 ms de duración en incrementos de 5 mV entre -90 y +30 mV, desde un potencial de fijación a -120 mV. Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron al valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente (pA/pF).

En el **panel A** de la **Figura V.37** se muestra una familia representativa de trazos de la I_{Na} generada en tres células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. Como se puede apreciar, la amplitud de la corriente resultó prácticamente indistinguible tanto en presencia como en ausencia de dicho factor (WT o mutado). De hecho, en el **panel B** de la misma figura se muestran las relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V), con la morfología de campana invertida característica de los canales Nav1.5, obtenidas al representar la densidad de la corriente, medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial del pulso aplicado. Efectivamente, ni Tbx20 WT ni p.R311C fueron capaces de modificar la densidad de la I_{Na} a ninguno de los potenciales con respecto a la registrada en las células HL-1 sin transfectar (**Figura V.37, panel B**) ($P > 0.05$).

El análisis de las cinéticas de activación e inactivación se realizó ajustando los trazos de corriente máxima a una función monoexponencial o biexponencial, respectivamente, obteniéndose así las correspondientes constantes de tiempo (**Tabla V.8**). Como podemos observar, ninguna de las formas de Tbx20 modificó la dependencia de tiempo de la activación ni de la inactivación de la I_{Na} ($P > 0.05$).

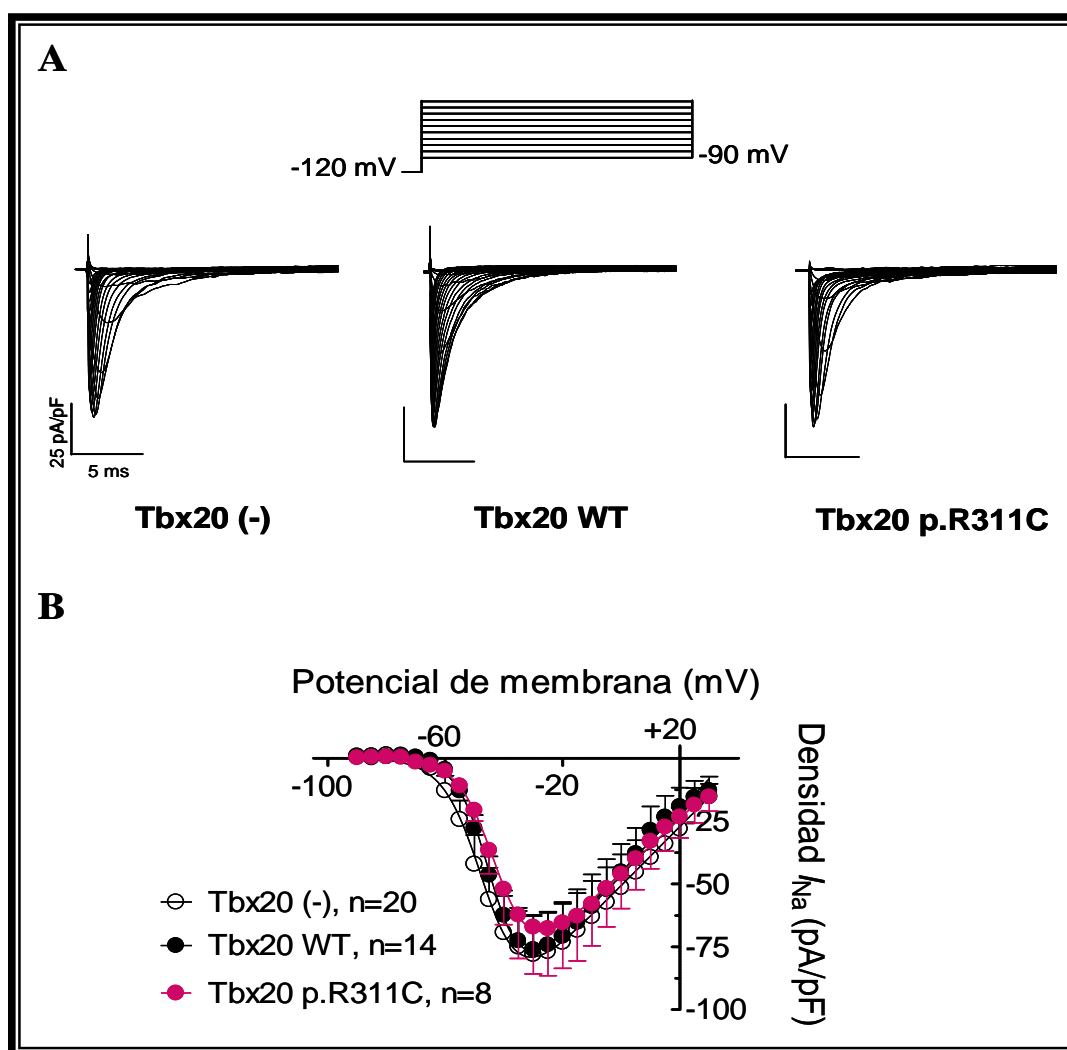


Figura V.37. Características electrofisiológicas de la I_{Na} generada en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o p.R311C. (A) Familias de trazos de la I_{Na} registrada en tres células HL-1 de cada uno de los grupos experimentales tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior. (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la I_{Na} obtenidas al representar la densidad de la corriente, medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial del pulso aplicado. Cada punto representa la media±EEM de “n” células de cada grupo.

Células HL-1	I_{Na}						
	τ_{act} (ms)	V_{hact} (mV)	k_{act}	τ_{finact} (ms)	τ_{sinact} (ms)	V_{hinact} (mV)	k_{inact}
Tbx20 (-)	0.19±0.01	-40.6±4.3	6.8±1.1	1.2±0.1	6.4±1.1	-92.9±2.0	5.1±0.3
Tbx20 WT	0.21±0.04	-43.9±0.7	5.9±0.4	1.4±0.2	6.4±1.0	-90.3±2.0	5.0±0.4
Tbx20 p.R311C	0.16±0.01	-39.9±2.1	6.4±0.2	1.5±0.3	7.4±1.4	-92.3±3.1	5.6±0.3

Tabla V.8. Parámetros de la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Na} registrada en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. τ_{act} , constante de tiempo de la cinética de activación; V_{hact}/k_{act} y V_{hinact}/k_{inact} , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación e inactivación, respectivamente; τ_{finact} y τ_{sinact} , constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*) de la cinética de inactivación. Cada valor representa la media±EEM de n ≥ 8 experimentos/células.

Por otro lado, se representaron las curvas de activación e inactivación de la I_{Na} en presencia o ausencia de Tbx20 (WT y mutado) (**Figura V.38**). Las curvas de activación (**Figura V.38, panel A**), como ya hemos dicho en el apartado 3.1, representan la dependencia de voltaje de la transición del canal desde el estado cerrado al estado abierto. Estas curvas se obtuvieron al representar los valores de conductancia normalizados en función del potencial de membrana. La conductancia a cada potencial se calculó utilizando la **ecuación IV.3** (ver Materiales y Métodos). Por su parte, la dependencia de voltaje de la inactivación se estudió mediante un protocolo de doble pulso en el cual se aplicaban pulsos de 500 ms de duración desde -130 hasta -30 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación -120 mV), seguidos de un pulso test a -20 mV. Este protocolo nos permitió obtener las curvas de inactivación, las cuales representan la dependencia de voltaje desde el estado cerrado al estado inactivo del canal. Dichas curvas se representaron a partir de la amplitud de la corriente obtenida en el pulso test, normalizada con respecto al pico de corriente máxima, en función del potencial de membrana del pulso previo (**Figura V.38, panel B**). En ambos casos, el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos permitió obtener los valores del punto medio (V_{hact} y V_{hinact} , respectivamente) y de la pendiente (k_{act} y k_{inact} , respectivamente) para cada experimento (**Tabla V.8**).

Como se puede apreciar, ni Tbx20 WT ni Tbx20 p.R311C modificaron la dependencia de voltaje de la activación ni de la inactivación de la I_{Na} (**Figura V.38 y Tabla V.8**).

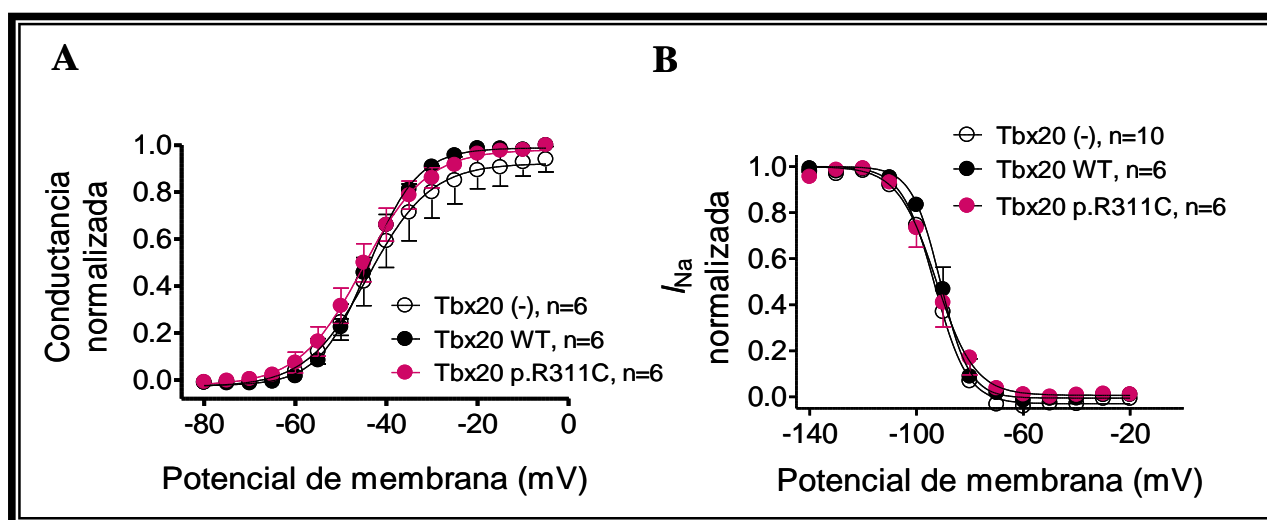


Figura V.38. Curvas de activación (A) e inactivación (B) de la I_{Na} generada en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o p.R311C. En ambos casos, el ajuste mediante una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el punto medio (V_{hact}/V_{hinact}) y la pendiente (k_{act}/k_{inact}) de cada una de las curvas, respectivamente. En A y B, cada punto representa la media \pm EEM de “n” células de cada grupo.

Diversos estudios han demostrado que las mutaciones en los canales de Na^+ responsables del desarrollo de SQT3 producen una ganancia de función de dichos canales o una modificación del

acoplamiento activación-inactivación (Wang y cols., 1995; Splawski y cols., 2000; George, 2005; Napolitano y cols., 2006). El resultado es un aumento de la I_{Na} durante la fase de meseta del PA correspondiente al componente tardío de dicha corriente ($I_{Na,L}$). Aunque la amplitud de la $I_{Na,L}$ es muy pequeña (≈ 0.5 -2% respecto a la amplitud máxima de la I_{Na}) su papel es crítico en el control de la DPA (Bennett y cols., 1995; Dumaine y cols., 1996; Tamargo, 2000). Es por ello que nos planteamos si Tbx20 podría estar regulando la $I_{Na,L}$ y, en consecuencia, un aumento de dicho componente podría estar implicado en la aparición de SQTl en la familia estudiada. Registramos, por tanto, la $I_{Na,L}$ en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g) aplicando un protocolo de pulsos de 500 ms de duración a -20 mV desde un potencial de fijación a -120 mV.

En el **panel A** de la **Figura V.39** se muestra una familia de trazos superpuestos de la I_{Na} registrada en tres células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. La $I_{Na,L}$ fue cuantificada como la densidad de corriente medida al final del pulso de 500 ms (**Figura V.39, panel B**). Como se puede observar, ni Tbx20 WT ni Tbx20 p.R311C modificaron la $I_{Na,L}$ con respecto a células control sin transfectar ($P > 0.05$).

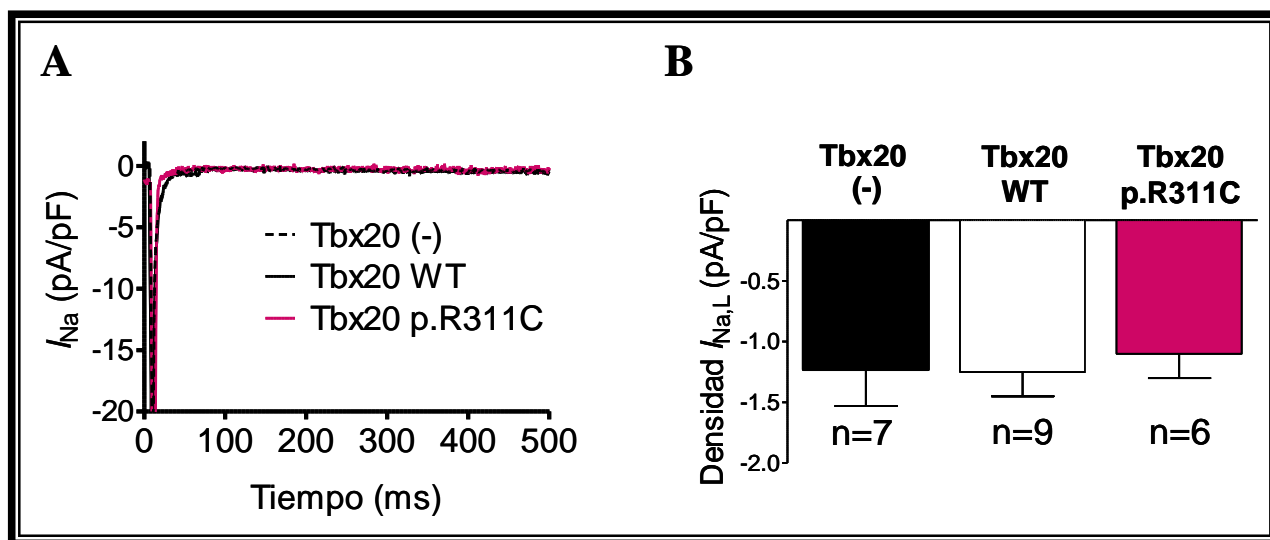


Figura V.39. Ni Tbx20 WT ni p.R311C modificaron la $I_{Na,L}$ registrada en células HL-1. (A) Trazos superpuestos de la I_{Na} registrados en tres células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C al aplicar un protocolo de pulsos de 500 ms de duración a -20 mV. (B) Gráfico de barras representando el valor medio de la $I_{Na,L}$ medida al final del pulso de -20 mV. Cada barra representa la media \pm EEM de “n” células de cada grupo.

5.3.2. Efecto de Tbx20 sobre la transcripción de los genes *SCN5A* y *SCN2B* humanos en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa

Analizamos la actividad luciferasa utilizando los promotores mínimos de los genes *SCN5A* y *SCN2B* humanos con el fin de determinar si Tbx20, tanto en su forma WT como mutada, controlaba la transcripción de dichos genes. El ensayo se realizó en células HL-1 transfectadas con el vector que codifica la expresión del enzima luciferasa pLightSwitch_Prom portando, por separado, los promotores mínimos de dichos genes. Además, las células fueron transfectadas con un vector vacío [Tbx20 (-)] utilizado como control, o el vector que codifica Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. En la **Figura V.40** se puede observar que Tbx20, tanto WT como p.R311C, no modifica la transcripción del gen *SCN5A* (**panel A**). Por el contrario, Tbx20 WT, pero no Tbx20 p.R311C, aumentó de forma significativa la transcripción de *SCN2B* (**panel B**) con respecto a las células control [Tbx20 (-)] ($P<0.01$).

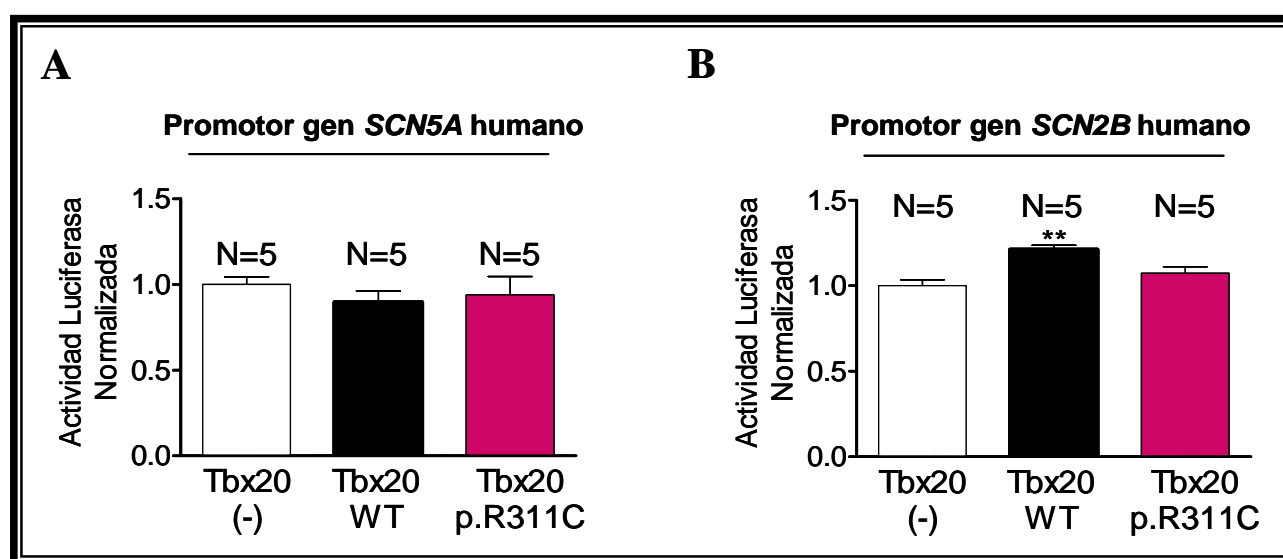


Figura V.40. Ensayo de detección de la actividad luciferasa en células HL-1 transfectadas con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. El ensayo fue realizado con el promotor del gen humano *SCN5A* (A) o *SCN2B* (B). En ambos casos, la actividad luciferasa obtenida fue normalizada a la actividad luciferasa basal presente en aquellas células control [Tbx20 (-)]. En A y B, cada barra representa la media \pm EEM de “N” experimentos/placas. ** $P<0.01$ frente a Tbx20 (-).

Estos resultados serían compatibles con el hecho de que, como hemos mencionado en el apartado 5.3, en la región promotora del gen humano *SCN5A* no existen secuencias consenso para la unión de Tbx20, pero sí en el promotor de *SCN2B*. Aun así, el efecto pro-transcripcional observado por parte de Tbx20 WT sobre los niveles de expresión del gen *SCN2B* no se correlacionan con un aumento en la amplitud de la I_{Na} (**Figura V.36**).

Se puede confirmar que ninguna de las formas de Tbx20 (WT o p.R311C) regula la I_{Na} generada en el miocardio adulto humano. Por tanto, la aparición del SQTl en la familia objeto de estudio no se puede atribuir a los efectos producidos por p.R311C Tbx20 sobre la I_{Na} .

5.4. Análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre la $I_{Ca,L}$

El gen *CACNA1C* codifica la subunidad conductora de los canales de Ca^{2+} (Cav1.2) responsables de generar la $I_{Ca,L}$ en el miocardio humano. Como se ha mencionado en el apartado de Introducción, estos canales están formados por el ensamblaje de subunidades α ó Cav1.2 y subunidades reguladoras β y α_2/δ (codificadas por los genes *CACNA2D1* y *CACNB2*, respectivamente). El promotor del gen *CACNA1C* de ratón, pero no el humano, exhibe un sitio de unión específico para Tbx20 (**Tabla V.3**). Por su lado, ni el promotor del gen *CACNA2D1* ni el de *CACNB2* poseen secuencias consenso de unión a dicho factor en ninguna de las dos especies (**Tabla V.3**).

Estudios previos han asociado diversas mutaciones de ganancia de función en los genes que codifican los canales de Ca^{2+} con la aparición de SQTl (Tester y Ackerman, 2014; Betzenhauser y cols., 2015) y es por ello que nos planteamos si la $I_{Ca,L}$ podría estar implicada en el desarrollo de SQTl en la familia estudiada. Por este motivo, realizamos un análisis del efecto producido por Tbx20 (WT y p.R311C) sobre la $I_{Ca,L}$ a través de un estudio electrofisiológico en células HL-1 e hiPSC-CMs así como un análisis confirmatorio de los resultados obtenidos mediante un WB y un ensayo de detección de la actividad luciferasa.

5.4.1. Efecto de Tbx20 sobre la $I_{Ca,L}$ generada en células HL-1. Estudio electrofisiológico

La $I_{Ca,L}$ fue registrada en células HL-1 transfectadas o no de manera transitoria con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g). En estos experimentos, la $I_{Ca,L}$ fue registrada utilizando Ba^{2+} como portador de cargas (I_{Ba}) (Barana y cols., 2014; Perez-Hernandez y cols., 2016) ya que de esta manera se ralentiza la inactivación de la corriente y aumenta su tamaño y su estabilidad en el tiempo. La I_{Ba} fue registrada mediante la técnica de *patch-clamp* aplicando un protocolo de pulsos de 500 ms en incrementos de 10 mV entre -40 y +70 mV desde un potencial de fijación a -30 mV. Todos los valores de amplitud de corriente (pA) se normalizaron al valor de la capacitancia (pF) de cada célula para obtener la densidad de corriente (pA/pF).

En el **panel A** de la **Figura V.41** se muestra una familia representativa de trazos de la I_{Ba} generada en tres células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o p.R311C. Como podemos

apreciar, la transfección con Tbx20, tanto WT como mutado, aumentó notablemente y de manera similar la amplitud de la corriente con respecto a las células sin transfectar. En el **panel B** de la misma figura se muestran las relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) obtenidas al representar la densidad de la corriente, medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial del pulso aplicado. Estos datos demuestran que Tbx20 tanto WT como p.R311C aumentaron significativamente la I_{Ba} con respecto a la de las células sin transfectar a potenciales entre +10 y +40 mV (**Figura V.41, panel B**) ($P < 0.05$).

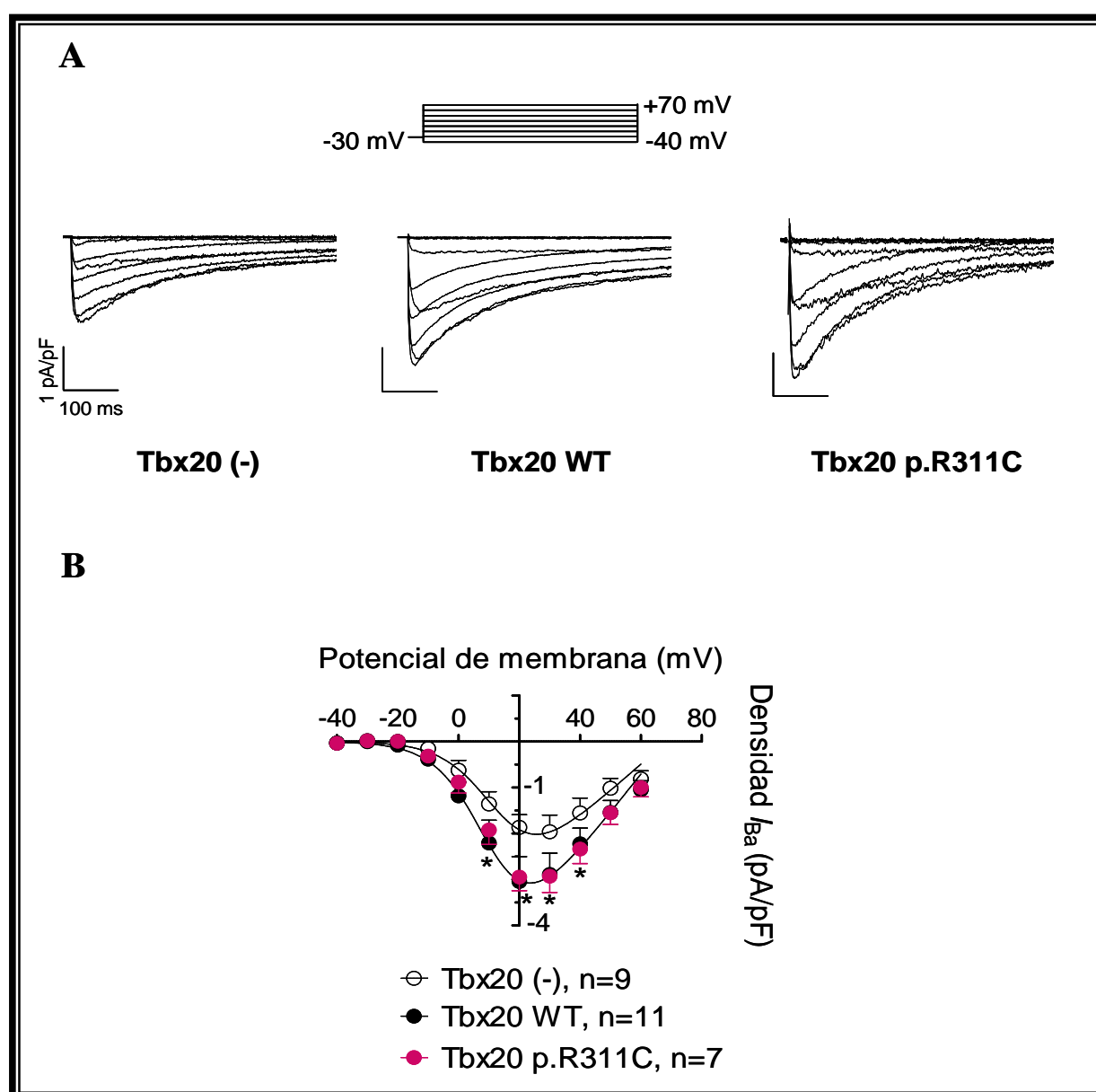


Figura V.41. Características electrofisiológicas de la I_{Ba} generada en células HL-1. (A) Familias de trazos de la I_{Ba} registrados tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior en tres células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la I_{Ba} obtenidas al representar la densidad de la corriente medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso en función del voltaje aplicado. Cada punto representa la media \pm EEM de “n” células de cada grupo. * $P < 0.05$ frente a células sin transfectar [Tbx20 (-)].

El curso temporal de la activación y la inactivación de la $I_{Ca,L}$ se cuantificó ajustando una función monoexponencial a los trazos de corriente máxima, lo que permitió obtener las correspondientes constantes de tiempo (**Tabla V.9**). Ni Tbx20 WT ni p.R311C modificaron la cinética de la activación ni de la inactivación de la $I_{Ca,L}$ (**Tabla V.9**) ($P>0.05$).

Células HL-1	I_{Ba}					
	τ_{act} (ms)	V_{hact} (mV)	k_{act}	τ_{inact} (ms)	V_{hinact} (mV)	k_{inact}
Tbx20 (-)	1.9±0.4	8.8±1.4	6.6±0.9	218±46	-14.7±3.8	7.2±0.9
Tbx20 WT	1.5±0.1	10.8±1.3	6.9±0.4	187±16	-15.6±3.3	7.3±1.9
Tbx20 p.R311C	1.6±0.2	9.0±1.5	6.8±1.1	168±13	-16.4±3.2	7.6±0.9

Tabla V.9. Parámetros de la dependencia de tiempo y de voltaje de la I_{Ba} registrada en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. τ_{act} , constante de tiempo de la cinética de activación; V_{hact}/k_{act} y V_{hinact}/k_{inact} , valores del punto medio y la pendiente de las curvas de activación e inactivación, respectivamente; τ_{inact} y τ_{sinact} , constantes de tiempo rápida (*fast*) y lenta (*slow*) de la cinética de inactivación. Cada valor representa la media±EEM de $n \geq 7$ experimentos/células.

En la **Figura V.42** se representan las curvas de activación (**panel A**) e inactivación (**panel B**) de los canales de Ca^{2+} en presencia o ausencia de Tbx20 WT o Tbx20 mutado. Las curvas de activación se obtuvieron a partir de los valores de conductancia normalizados en función del potencial de membrana. La conductancia a cada potencial de membrana se calculó utilizando la **ecuación IV.5** (ver Materiales y Métodos). Las curvas de inactivación, por su parte, se obtuvieron al aplicar un protocolo de doble pulso con un primer pulso de 500 ms de duración desde -50 mV hasta +20 mV en incrementos de 10 mV (potencial de fijación -30 mV), seguido de un segundo pulso test a +20 mV. Posteriormente, se representó la amplitud de corriente obtenida en el pulso test, normalizada con respecto al pico de corriente máxima, en función del potencial de membrana del pulso previo. En ambos casos, el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos permitió obtener los valores del punto medio (V_{hact} y V_{hinact} , respectivamente) y de la pendiente (k_{act} y k_{inact} , respectivamente) para cada experimento (**Tabla V.9**). Como se puede apreciar, ninguna de las formas de Tbx20 (WT o mutado) modificó la dependencia de voltaje de la activación ni de la inactivación de la $I_{Ca,L}$ (**Figura V.42** y **Tabla V.9**) ($P>0.05$).

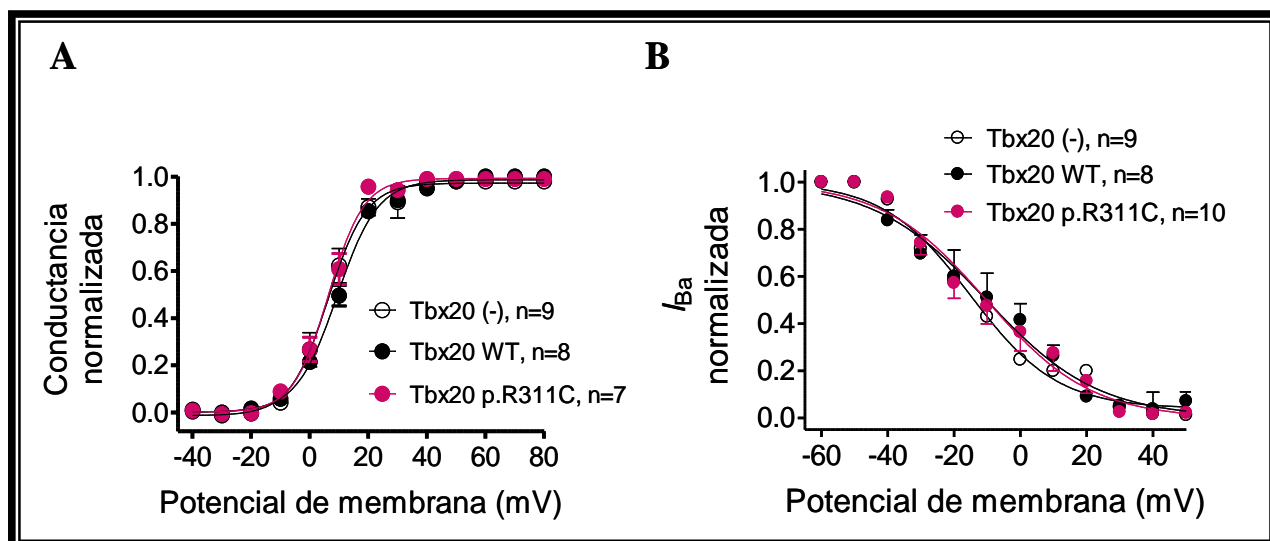


Figura V.42. Representación de la dependencia de voltaje de la activación y la inactivación de la I_{Ba} generada en células HL-1. Curvas conductancia-voltaje (A) y curvas de inactivación (B) obtenidas en células HL-1 transfectedas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. En ambos casos, el ajuste mediante una función de Boltzmann a los datos permitió obtener el punto medio (V_{hact}/V_{hinact}) y la pendiente (k_{act}/k_{inact}) de cada una de las curvas, respectivamente. En A y B, cada punto representa la media \pm EEM de “n” células de cada grupo.

5.4.2. Efecto de Tbx20 sobre los niveles de expresión de los canales Cav1.2 en células HL-1.

Ensayo de WB

Teniendo en cuenta los resultados del estudio electrofisiológico, nos planteamos si la modificación producida en la $I_{Ca,L}$ por parte de Tbx20 (WT o mutado) sería consecuencia de una regulación en los niveles de expresión de los canales Cav1.2 en las células HL-1. Por este motivo, llevamos a cabo un análisis por WB y determinamos cuantitativamente el grado de expresión de dichos canales en células HL-1 transfectedas o no con Tbx20 WT (2 μ g) o Tbx20 p.R311C (2 μ g).

En la **Figura V.43** se muestra la imagen representativa de WB (**panel A, izquierda**) en la que la subunidad Cav1.2 aparece con un peso aproximado de 250 kDa (indicado con una flecha). Como se puede apreciar, la intensidad de la banda correspondiente a Cav1.2 en presencia de Tbx20 WT (carril 2) o la longitud de ésta en presencia de p.R311C (carril 3), aumentan con respecto a aquella banda detectada en las células sin transfectar [Tbx20 (-)] (carril 1). Efectivamente, si observamos el análisis densitométrico de las bandas (**Figura V.43, panel B**) representado a partir de los niveles de expresión de los canales Cav1.2 normalizados a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis (**panel A, derecha**), podemos confirmar que Tbx20, tanto WT como mutado, aumenta significativamente, y de forma similar, la expresión de los canales Cav1.2 con respecto a la de las células sin transfectar ($P < 0.05$).

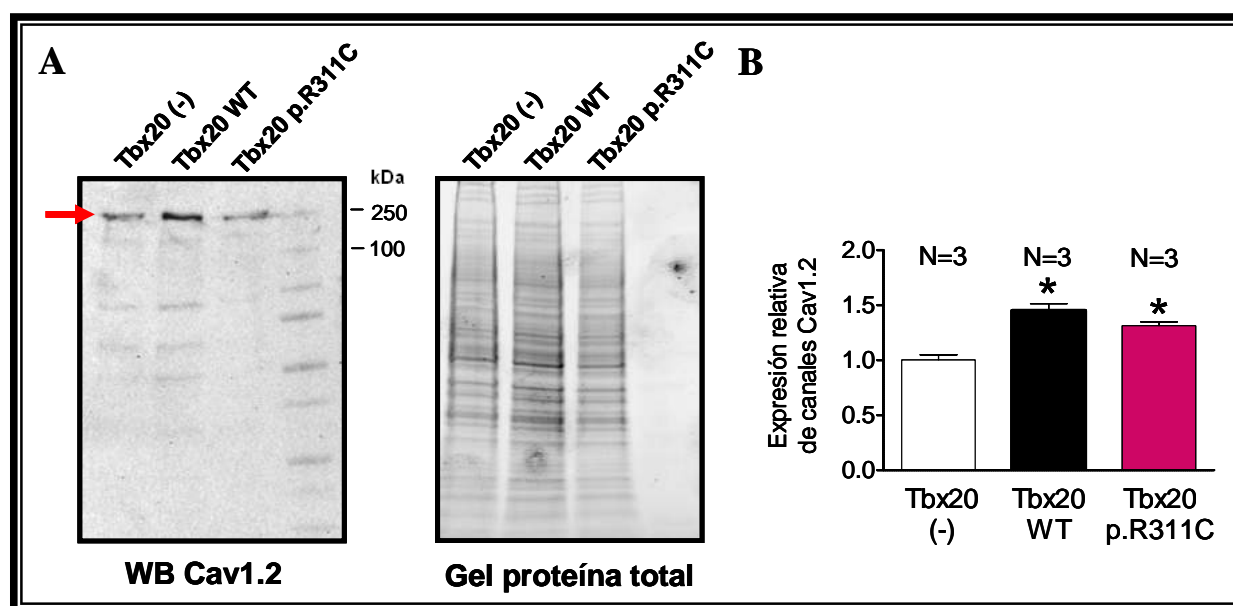


Figura V.43. Western blot (WB) para detectar la expresión de canales Cav1.2 en células HL-1 transfectadas o no con Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. (A) Membrana de WB (izquierda) y gel de electroforesis mostrando la proteína total utilizado como control de carga (derecha). La flecha roja indica la presencia de Cav1.2 (alrededor de 250 kDa). El último carril de la derecha (carril 4) corresponde con el patrón de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standards All Blue*, 10-250 kDa). (B) Análisis densitométrico de las bandas de Cav1.2 normalizadas a la cantidad de proteína total presente en cada carril del gel de electroforesis. Cada barra representa la media±EEM de “N” experimentos/placas utilizados en cada grupo. *P<0.05 frente a células sin transfectar [Tbx20 (-)].

5.4.3. Efecto de Tbx20 sobre la $I_{Ca,L}$ generada en hiPSC-CMs. Estudio electrofisiológico

Registramos también la $I_{Ca,L}$ en hiPSC-CMs infectadas o no con partículas lentivirales portando vectores específicos que codificaban, por separado, Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. Además, dichos vectores codificaban GFP lo que permitía identificar mediante microscopía de fluorescencia las células infectadas. En este caso, el protocolo generado para el registro de la corriente consistió en pulsos de 200 ms de duración en incrementos de 10 mV desde un potencial de fijación de -80 mV a potenciales entre -50 y +60 mV. Además, se aplicó un prepulso de 50 ms de duración a -30 mV antes de cada pulso test para activar e inactivar la I_{Na} .

En la **Figura V.44** se muestra una familia representativa de trazos (**panel A**) así como las relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) (**panel B**) de la $I_{Ca,L}$ generada en hiPSC-CMs bajo cada condición de infección. Como se puede observar, en comparación con los resultados obtenidos en HL-1, en este caso ni Tbx20 WT ni Tbx20 p.R311C modificaron de forma significativa la $I_{Ca,L}$ a ninguno de los potenciales con respecto a las células sin infectar [Tbx20 (-)] (P>0.05). Este resultado sería compatible con el hecho de que, a diferencia del ratón, en el promotor del gen *CACNA1C* humano no existen secuencias consenso de unión a Tbx20 (**Tabla V.3**).

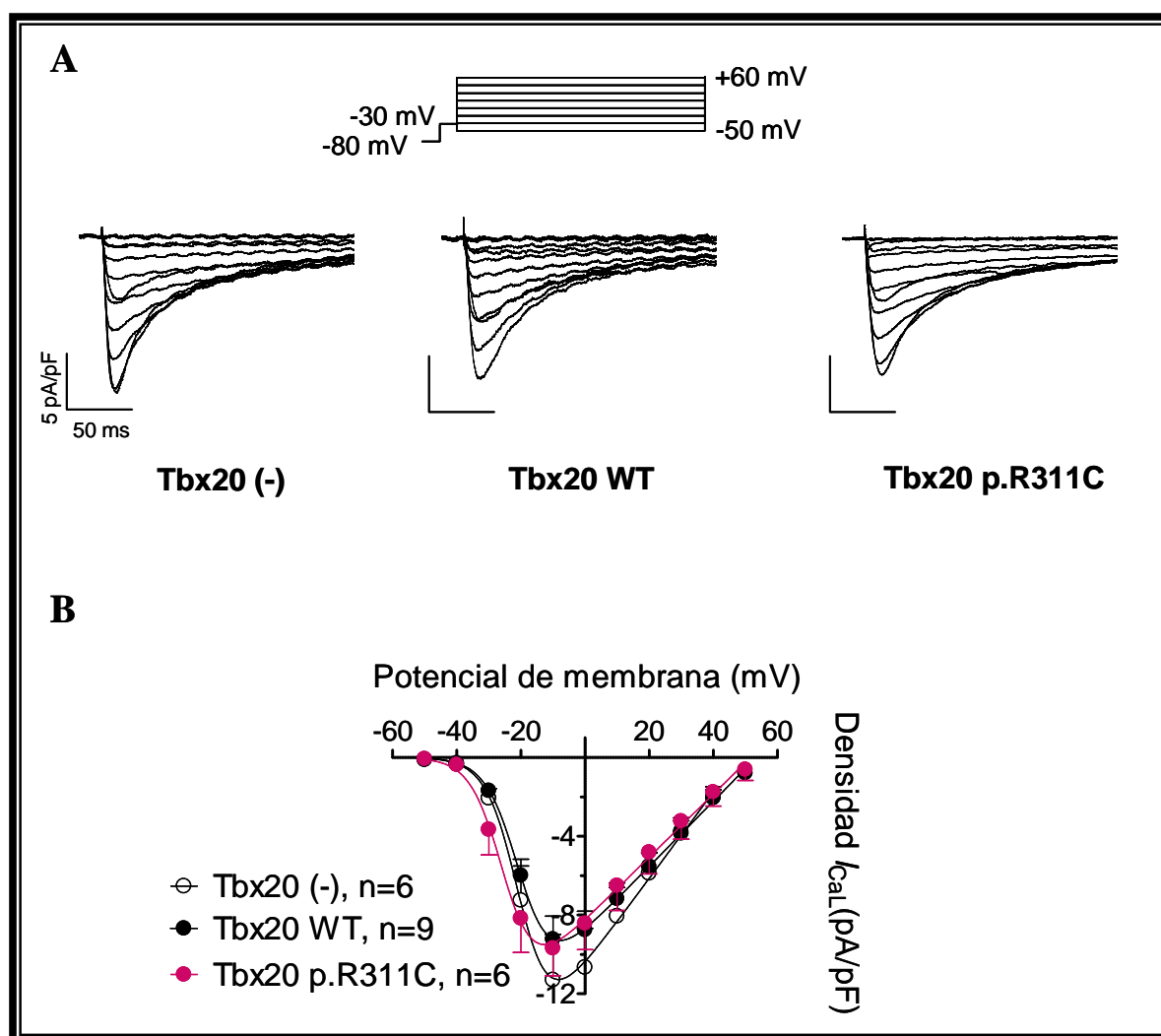


Figura V.44. Características electrofisiológicas de la $I_{Ca,L}$ generada en hiPSC-CMs. (A) Familias de trazos de la $I_{Ca,L}$ registrada tras aplicar el protocolo mostrado en la parte superior en tres hiPSC-CMs infectadas o no con constructos lentivirales que codificaban Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. (B) Relaciones densidad de corriente-voltaje (I-V) de la $I_{Ca,L}$ obtenidas al representar la densidad de la corriente, medida como la diferencia entre el pico máximo y el final de cada pulso, en función del potencial del pulso aplicado. Cada punto representa la media \pm EEM de “n” experimentos/células.

5.4.4. Efecto de Tbx20 sobre la transcripción del gen *CACNA1C* humano en células HL-1.

Ensayo de detección de la actividad luciferasa

Con el fin de analizar si Tbx20, tanto WT como p.R311C, es capaz de regular la transcripción del gen *CACNA1C* humano, llevamos a cabo un estudio de detección de la actividad luciferasa en células HL-1 transfectadas con el vector de expresión del enzima luciferasa pLightSwitch_Prom portando el promotor mínimo de dicho gen. Además, las células fueron transfectadas con un vector vacío [Tbx20 (-)] utilizado como control, o con el vector codificando Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. La **Figura V.45** representa un gráfico de barras con los niveles de actividad luciferasa, medidos en cada grupo experimental, y normalizados a la actividad luciferasa basal presente en las células

[Tbx20 (-)]. Como se puede apreciar, ni Tbx20 WT ni Tbx20 p.R311C modificaron los niveles de transcripción del gen *CACNA1C* ($P>0.05$), resultado que sería compatible con el hecho de que, en dicho promotor no existe una secuencia consenso de unión a Tbx20 (**Tabla V.3**).

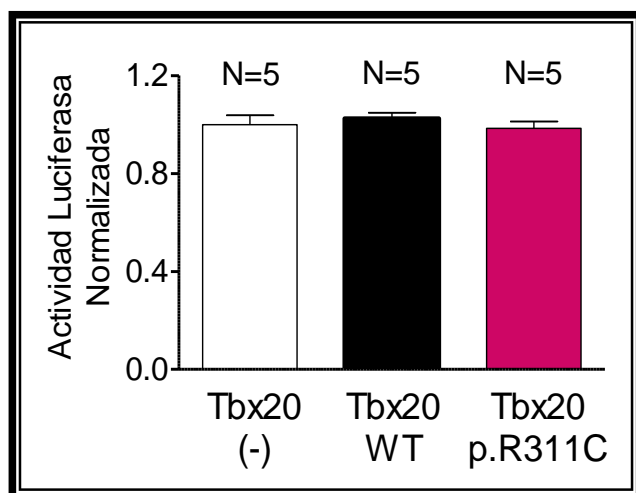


Figura V.45. Ensayo de detección de la actividad luciferasa en células HL-1. Las células fueron transfectadas con el vector de expresión del enzima luciferasa portando el promotor mínimo del gen humano *CACNA1C*. Además, las células fueron transfectadas con un vector vacío [Tbx20 (-)] utilizado como control, o con el vector codificando Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. La actividad luciferasa obtenida se normalizó a la actividad luciferasa basal presente en aquellas células control [Tbx20 (-)]. Cada barra representa la media±EEM de “N” experimentos/placas.

En base a los resultados obtenidos en el apartado 4, podemos confirmar que ninguna de las formas de Tbx20 (WT o p.R311C) regula la $I_{Ca,L}$ generada en el miocardio humano. Por tanto, la aparición del SQTl en la familia objeto de estudio no se puede atribuir a los efectos producidos por p.R311C Tbx20 sobre la $I_{Ca,L}$.

6. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA VARIANTE c.-66A>G EN EL GEN *KCNN3*

Además de las variantes encontradas en los genes *KCNH2* y *TBX20*, el análisis de secuenciación masiva de última generación en la familia de estudio identificó una mutación en el probando (**II:4**), la hermana **II:6** y el sobrino **III:1** (**Figura V.9**) en el extremo 5'UTR del gen *KCNN3* (c.-66A>G), concretamente en la región promotora de dicho gen (**Figura V.10**).

El gen *KCNN3* codifica los canales de potasio de baja conductancia activados por Ca^{2+} tipo 3 (SK3), los cuales son activados durante la etapa de contracción del músculo cardíaco, cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular se elevan, generando una corriente de salida que repolariza la membrana de los cardiomiocitos y acorta con ello la DPA (Chang y Chen, 2015). A pesar de que estos canales se encuentran localizados tanto en aurículas como ventrículos (Xu y cols., 2003; Tuteja y cols., 2005; Tuteja y cols., 2010), en condiciones fisiológicas participan, fundamentalmente, en el proceso de repolarización auricular (Nagy y cols., 2009; Skibsbbye y cols., 2014; Zhang y cols., 2014). Sin embargo, en diversas enfermedades cardíacas como la hipertrofia, isquemia o la insuficiencia cardíaca, los canales SK3 son activados también a nivel ventricular,

favoreciendo la aparición de post-despolarizaciones precoces (*early afterdepolarizations* o EADs) y/o fibrilación ventricular (Chua y cols., 2011; Chang y Chen, 2015; Mizukami y cols., 2015).

Se ha demostrado que diversas mutaciones que producen la pérdida de función en los canales SK3 favorecen la aparición de fibrilación auricular (Ellinor y cols., 2010; Chang y Chen, 2015). Por otro lado, la sobreexpresión de dichos canales en ratón se encuentra asociada con un mayor riesgo de padecer muerte súbita asociada a bradiarritmias y bloqueo cardíaco, posiblemente debido a un bloqueo funcional en el nodo AV (Mahida y cols., 2014; Chang y Chen, 2015).

Sabiendo esto, nos planteamos si la mutación en la región promotora del gen *KCNN3* podría estar relacionada con la prolongación de la DPA implicada en la aparición de SQTl en nuestra familia de estudio. Por este motivo, analizamos las características electrofisiológicas de la corriente generada por los canales SK3 así como un estudio funcional de la mutación en el promotor de dicho gen a través de un ensayo de detección de la actividad luciferasa.

6.1. Características electrofisiológicas de la corriente generada por los canales SK3 en células CHO

En un primer paso, tratamos de analizar el grado de participación de la corriente generada por los canales SK3 (I_{SK3}) durante el desarrollo de un PA. Para ello, registramos dicha corriente mediante la técnica de *patch-clamp* en células CHO transfectadas transitoriamente con el ADNc codificando los canales SK3 (1.6 μ g), aplicando un protocolo de pulsos con morfología de PA procedentes del endocardio ventricular humano. En el **panel A** de la **Figura V.46** se muestra un trazo representativo de la I_{SK3} (parte inferior del panel) generada al aplicar el correspondiente protocolo de PA (parte superior). Como puede apreciarse, la dependencia de tiempo de la conductancia de los canales resultó muy similar a la de la morfología del PA, lo que sugiere que la relación de la conductancia con el potencial de membrana es lineal. También registramos la I_{SK3} registrada al aplicar una rampa de 500 ms de duración desde -100 a +50 mV (potencial de fijación a -80 mV) (**Figura V.46, panel B**). Como puede observarse en la parte inferior del **panel B**, efectivamente la conductancia es lineal, y sólo a potenciales más despolarizados de +30 mV se observa una pequeña disminución de la corriente, consecuencia del fenómeno de rectificación interna que poseen dichos canales (Adelman y cols., 2012).

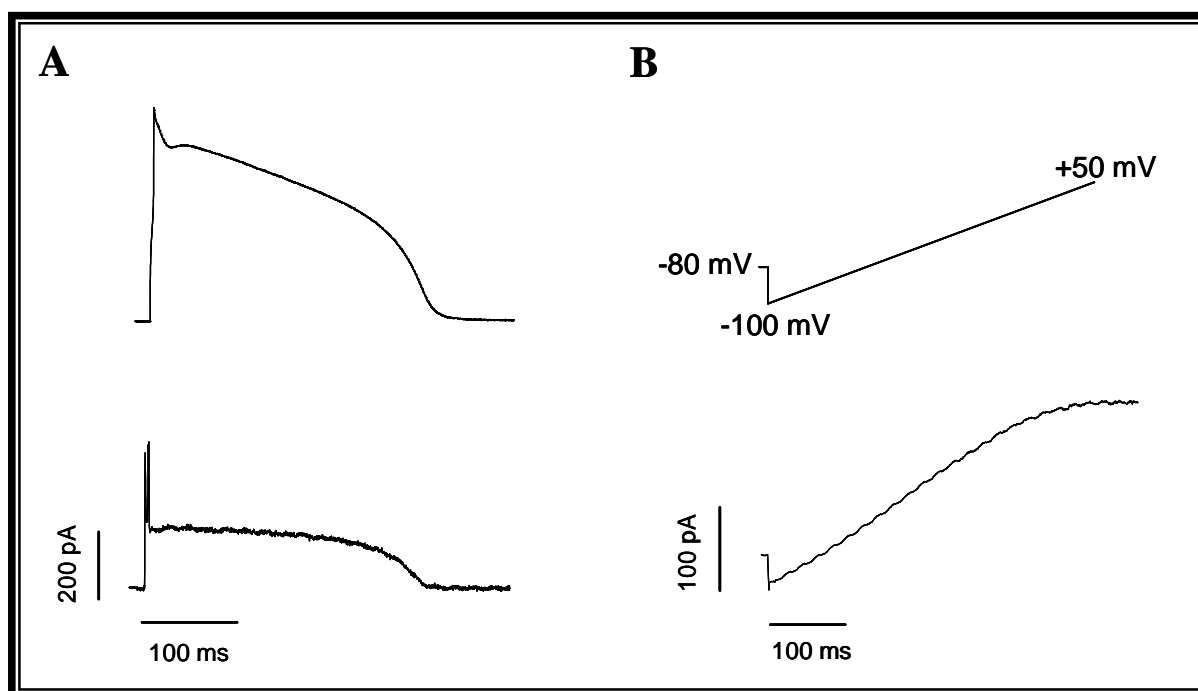


Figura V.46. Análisis funcional de los canales SK3 en células CHO. (A) Trazo representativo de la I_{SK3} registrado en una célula CHO transfectada con los canales SK3 al aplicar el protocolo con morfología de PA endocárdico ventricular humano mostrado en la parte superior. (B) Trazo representativo de la I_{SK3} registrado en una célula CHO transfectada con los canales SK3 y aplicando el protocolo de rampa mostrado en la parte superior.

6.2. Efecto de Tbx20 sobre transcripción del gen *KCNN3* en células HL-1. Ensayo de detección de la actividad luciferasa

Tras analizar funcionalmente los canales SK3, tratamos de averiguar si la mutación c.-66A>G en el promotor del gen *KCNN3* estaría afectando a su transcripción. Para ello, realizamos un ensayo de detección de la actividad luciferasa en células HL-1 transfectadas transitoriamente con el vector de expresión del enzima luciferasa pLightSwitch_Prom portando, por separado, el promotor mínimo del gen *KCNN3* humano tanto en su forma WT como mutada (c.-66A>G). Además, las células fueron transfectadas con un vector vacío utilizado como control o con el vector codificando el factor de transcripción Sp1, del cual se conocen varias secuencias consenso de unión en la región promotora de dicho gen. Efectivamente, como se muestra en el **panel A** de la **Figura V.47**, el factor Sp1 aumentó de forma significativa la transcripción del gen *KCNN3* ($P < 0.05$ frente a células control). Sin embargo, dicho factor fue incapaz de ejercer un efecto transcripcional sobre el promotor en su forma mutada, no modificando por tanto los niveles de actividad luciferasa con respecto a los presentes en las células control (**Figura V.47, panel A**) ($P > 0.05$).

Por otro lado, y como se muestra en la **Tabla V.3**, el promotor del gen *KCNN3*, tanto en humano como en ratón, posee una secuencia consenso de unión a Tbx20. Así pues, nos planteamos

realizar un segundo ensayo de detección de actividad luciferasa y determinar si la mutación presente en el promotor del gen *KCNN3* podría estar afectando a la unión de dicho factor. Para ello, llevamos a cabo de nuevo el ensayo en células HL-1 transfectadas con el vector de expresión del enzima luciferasa pLightSwitch_Prom portando el promotor mínimo del gen humano *KCNN3* tanto en su forma WT como mutada (c.-66A>G). Además, y a diferencia del ensayo anterior, las células fueron transfectadas con un vector vacío [Tbx20 (-)] utilizado como control o con el vector codificando Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C.

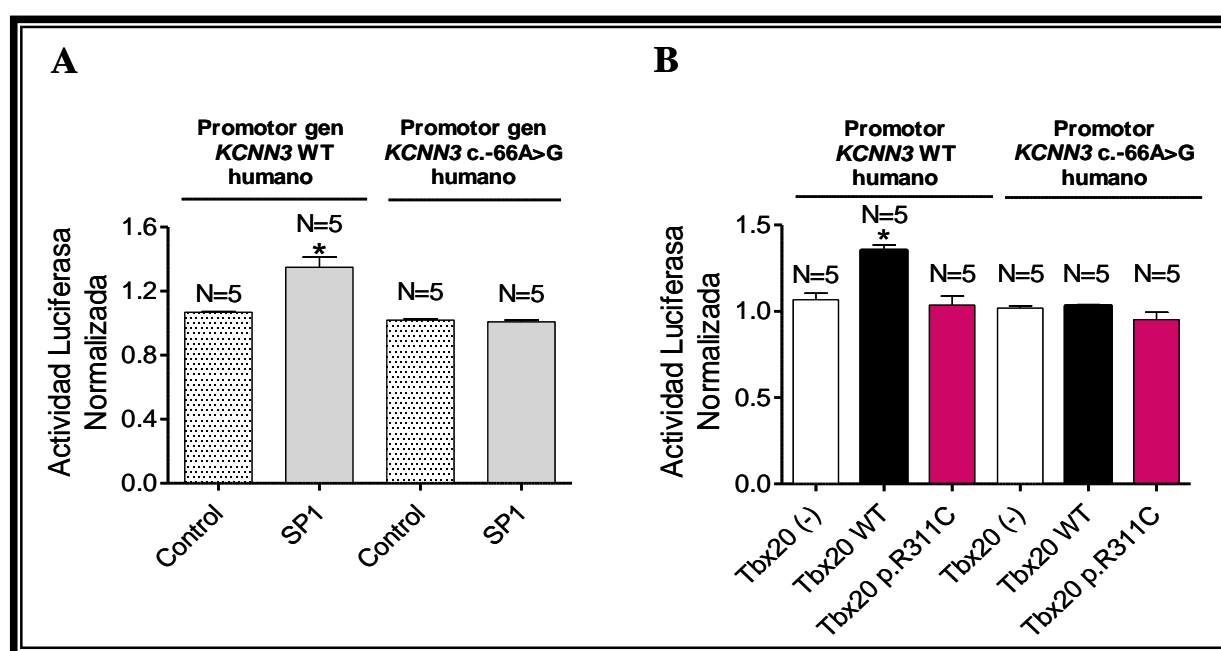


Figura V.47. Ensayo de detección de la actividad luciferasa en células HL-1. (A) Las células fueron transfectadas con el vector de expresión del enzima luciferasa portando el promotor mínimo del gen *KCNN3* humano bien en su forma WT o bien en la forma mutada (c.-66A>G). Además, dichas células fueron transfectadas con un vector vacío utilizado como control o con el vector codificando el factor de transcripción Sp1. * $P < 0.05$ frente a células control. (B) Las células fueron transfectadas con el vector de expresión del enzima luciferasa portando el promotor mínimo del gen humano *KCNN3* en su forma WT o mutada (c.-66A>G). Además, dichas células fueron transfectadas con un vector vacío [Tbx20 (-)] utilizado como control o con el vector codificando Tbx20 WT o Tbx20 p.R311C. * $P < 0.05$ frente a Tbx20 (-). En A y B la actividad luciferasa obtenida fue normalizada a la actividad luciferasa basal presente en aquellas células control, respectivamente. Cada barra representa la media±EEM de “N” experimentos/placas de cada grupo experimental.

En el **panel B** de la **Figura V.47** se muestra la actividad luciferasa medida en cada grupo experimental y normalizada a la actividad luciferasa basal obtenida en las células control [Tbx20 (-)]. Como puede apreciarse, Tbx20 WT aumentó significativamente la transcripción del gen *KCNN3* ($P < 0.05$ frente a Tbx20 (-)). Sin embargo, dicho factor fue incapaz de ejercer un efecto pro-transcripcional sobre el promotor en su forma mutada, observándose unos niveles de actividad luciferasa muy similares a los obtenidos en las células control [Tbx20 (-)] ($P > 0.05$). Por otra parte,

Tbx20 p.R311C fue incapaz de modificar los niveles de actividad luciferasa en presencia del promotor tanto en su forma WT como mutada ($P>0.05$ frente a Tbx20 (-)).

Se puede considerar, por tanto, que la mutación c.-66A>G suprime completamente la transcripción del gen *KCNN3*, dando lugar a la aparición de haploinsuficiencia tanto en el probando (**II:4**) como en el resto de familiares portadores de la variante (hermana **II:6** y sobrino **III:1**). Además, el factor Tbx20 p.R311C es incapaz de ejercer un efecto transcripcional sobre el gen *KCNN3* WT, lo que da lugar también a un defecto en la expresión de los canales SK3 en aquellos sujetos portadores de la mutación en dicho factor. Sin embargo, estudios previos han demostrado que, en condiciones fisiológicas, el tratamiento con apamina (bloqueante selectivo de canales SK3) no modifica la DPA en muestras de preparaciones multicelulares tanto auriculares como ventriculares de diferentes especies, incluyendo el humano (Nagy y cols., 2009; Chang y Chen, 2015). En consecuencia, se podría afirmar que la corriente generada por los canales SK3 no va a participar en la fase de repolarización del PA cardíaco y, por tanto, la mutación en la región no es la responsable de la prolongación de la DPA implicada en la aparición de SQTl de nuestra familia de estudio.

VI. Discusión

En la presente Tesis Doctoral hemos descrito y analizado funcionalmente las consecuencias de tres mutaciones identificadas en los miembros de una familia española de origen africano diagnosticados con SQTl, con el fin de determinar cuál de ellas es responsable de la aparición de la enfermedad. De las tres variantes analizadas (en los genes *KCNH2*, *KCNN3* y *TBX20*, respectivamente) observamos que aquella presente en el gen *TBX20* (c.931C>T, pR311C) disminuyó significativamente y de manera selectiva la expresión de los canales hERG y la corriente (I_{Kr}) generada por estos canales, tanto en células HL-1 como en hiPSC-CMs. En estas últimas células, además, demostramos que la disminución de la I_{Kr} producida por la mutación resultó en una prolongación significativa de la DPA. Estos efectos sobre la I_{Kr} podrían dar lugar a la prolongación del intervalo QT del ECG observada en los portadores de la mutación en *TBX20*. Los resultados obtenidos demuestran, por primera vez, que el factor de transcripción Tbx20 controla la expresión del gen *KCNH2* en el miocardio adulto humano y, por tanto, el gen *TBX20* podría ser considerado un gen implicado en el desarrollo de SQTl.

1. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN hERG p.T152HfsX180

La mutación en heterocigosis en la región codificante del gen *KCNH2* (NM_000238.3:c.453dupC), codificando los canales hERG p.T152HfsX180, fue identificada mediante el correspondiente análisis genético en todos aquellos miembros de la familia diagnosticados con SQTl (probando **II:4** y hermanas **II:1** y **II:6**), pero en ninguno de los miembros no afectados. Es decir, dicha mutación apareció con una penetrancia completa en la familia. Como se ha descrito en el apartado de Introducción, las mutaciones de pérdida de función en el gen *KCNH2* son responsables del SQTl2. De hecho, las manifestaciones fenotípicas en los miembros afectados coincidieron con aquellas que caracterizan a dicho síndrome. El SQTl2 presenta un patrón electrocardiográfico característico en el que se observa la aparición de unas ondas T de baja amplitud y “melladas” (ó bífidas). Aunque es importante destacar que hasta el 20% de los casos de SQTl2 pueden presentar un ECG aparentemente “normal” que no permite el diagnóstico. La hermana **II-6** tiene ondas T de bajo voltaje y en ella el test de adrenalina fue positivo. Otra herramienta habitualmente utilizada en el diagnóstico de los síndromes arritmogénicos primarios hereditarios es la realización de tests de provocación mediante fármacos. En el caso del SQTl1 y del SQTl2 se puede utilizar un test de adrenalina que permite determinar la respuesta del miocardio al estrés, simulando un ejercicio físico. El test es positivo y, por tanto, diagnóstico del SQTl cuando tras la infusión de adrenalina se observa una marcada prolongación del intervalo QT.

Otro parámetro que puede facilitar el diagnóstico de estos pacientes es identificar el estímulo desencadenante de los eventos arrítmicos. En este contexto, los pacientes con SQT2 suelen presentar arritmias ventriculares desencadenadas por estrés emocional (49%) o estímulos auditivos súbitos (despertador) y con menos frecuencia durante el sueño (22%) o el ejercicio (29%) (Wilde y cols., 1999; Schwartz y cols., 2001). Además, las pacientes diagnosticadas con este subtipo de síndrome de QT largo son particularmente susceptibles a presentar arritmias en el período posparto (Kositseth y cols., 2004).

Podemos destacar que en la familia estudiada, el probando **II:4** sufrió un síncope al levantarse de la cama, probablemente desencadenado por el sonido del despertador. Otros miembros de la familia como las hermanas **II:2** y **II:5**, a pesar de ser inicialmente diagnosticadas de epilepsia, fallecieron de MSC a una edad muy temprana (19 y 17 años, respectivamente) y una de ellas además durante el periodo posparto. De hecho, podría ser que ambas tuvieran un SQT “enmascarado”, ya que a la hermana **II:2** se le llegó a realizar un ECG donde se observó que el intervalo QTc era de 440 ms, un valor que resulta completamente normal para una mujer. Numerosos estudios han demostrado que el SQT se presenta con una penetrancia baja y muy variable en la mayoría de familias afectadas (aproximadamente el 70% de casos si se trata de SQT2), lo que indica que muchos de los miembros portadores de una mutación patogénica van a presentar un intervalo QT normal en el ECG (definido como < de 400 ms) (Priori y cols., 1999; Priori y cols., 2003). Curiosamente, en el caso de la hermana **II:2** también se llevó a cabo un test de adrenalina pero resultó igualmente negativo. En este caso, hay que tener en cuenta que la sensibilidad y especificidad de este tipo de ensayos no es del 100%, de tal manera que un resultado negativo no implica que el paciente quede exento de padecer la enfermedad. Diversos autores han descrito diferentes porcentajes para estos parámetros en función de los valores control que emplean como referencia y de variables como la edad y el género de los individuos que se someten a la prueba. Así, mientras que en un estudio realizado por Vyas y colaboradores se observó una sensibilidad en el test de adrenalina del 92.5% y una especificidad del 86%, otros autores como Clur y colaboradores sugirieron porcentajes del 50 y 61%, respectivamente (Vyas y cols., 2005; Clur y cols., 2010).

Otro de los casos que también podría considerarse como SQT “enmascarado” es el de la madre (**I:2**) del probando, que a pesar de presentar un ECG “aparentemente normal” fue diagnosticada de SQT al experimentar un episodio de MSC resucitada durante un tratamiento con antibióticos mientras estaba siendo sometida a quimioterapia antineoplásica. La prolongación del intervalo QT debido a la exposición a diferentes fármacos es una manifestación fenotípica muy característica del SQT tanto de tipo congénito, sobre todo al tratarse de SQT2, como adquirido (Recanatini y cols., 2005; Perry y cols., 2010; El-Sherif y cols., 2018). En ambos casos, el principal

mecanismo implicado es el bloqueo de los canales hERG por la unión de dichos fármacos a aminoácidos localizados en el interior de la cavidad formadora del poro del canal (Hancox y cols., 2008). A diferencia de lo que sucede con el resto de canales iónicos, las características peculiares que definen al dominio del poro de los canales hERG, (tamaño más grande y flexible y la presencia de residuos aromáticos) van a favorecer que éstos puedan unirse a una enorme variedad de fármacos incluyendo, además de antiarrítmicos, otros fármacos muy diversos desde el punto de vista estructural como diuréticos, antihistamínicos, antifúngicos, antidepresivos, antipsicóticos, antibióticos, quimioterápicos antibacterianos o anticancerosos (Mitcheson y cols., 2000a; Tamargo, 2000; Caballero y cols., 2003; Fernandez y cols., 2004; Roden y Viswanathan, 2005; Vandenberg y cols., 2017).

Otra de las características a resaltar es que tres de las hermanas del probando (**II:1**, **II:2** y **II:5**) experimentaron convulsiones desde la etapa infantil que conllevó en todos los casos a un diagnóstico inicial de epilepsia. A menudo, el SQTl es diagnosticado erróneamente como epilepsia debido a la aparición de convulsiones generalizadas que en el caso del SQTl pueden ser secundarias al desarrollo de taquicardia ventricular del tipo TdP. La asociación de epilepsia y síndrome de QT largo es más frecuente con el SQTl2 que con otros tipos de SQTl, probablemente debido a que el gen *KCNH2* se expresa de forma abundante en el Sistema Nervioso Central (Johnson y cols., 2009; Zamorano-Leon y cols., 2012). Los canales hERG juegan un papel muy importante en el control de la homeostasis del K^+ dentro del sistema glial que conforma el hipocampo (Emmi y cols., 2000). Diversos estudios han demostrado que existe una relación directa entre la regulación de la concentración del K^+ en el espacio extraneuronal ejercida por los astrocitos y la actividad epileptiforme desarrollada a nivel del hipocampo (D'Ambrosio y cols., 1999). Este control en la concentración de K^+ es necesario para asegurar la propagación de los PAs neuronales de tal modo que cuando ésta resulta alterada (por ejemplo mediante la inhibición de la corriente generada por los canales hERG), aumenta el riesgo de desarrollar actividad epiléptica (Janigro y cols., 1997). En este contexto es destacable que el sobrino **III.2** del probando, portador de la mutación en el gen *TBX20* (NM_001077653.2:c.931C>T) que codifica el factor de transcripción mutante Tbx20 p.R311C, pero no la mutación p.T152HfsX180 en los canales hERG, también experimentó convulsiones. De hecho, y curiosamente, este miembro de la familia fue diagnosticado de epilepsia pero no de SQTl al presentar un corazón que en principio es eléctrica y estructuralmente normal. Además de la variante en *TBX20*, este sujeto porta una mutación en el gen *KCNH2* (NM000238.3:c.3203A>G), codificando los canales hERG p.Q1068R, que ya había sido descrita en la literatura (Anson y cols., 2004). Esta última variante también la portan dos de los hermanos del probando (**II.1** y **II.3**) y el otro sobrino (**III.1**). El análisis funcional previo realizado

por Anson y colaboradores demostró que la mutación p.Q1068R aceleraba de manera significativa la inactivación y la recuperación de la inactivación de los canales hERG, de forma que las constantes de tiempo de estos procesos se desplazaban aproximadamente 10-20 mV en su dependencia de voltaje con respecto a las de los canales WT (Anson y cols., 2004), lo que podría causar, en último término, una ligera disminución de la I_{Kr} en los pacientes portadores. Por tanto, sería posible que esta alteración del *gating* de los canales produjese una prolongación del intervalo QT. Sin embargo, esta mutación es considerada una variante benigna, que aparece con una frecuencia del 0.03% en sujetos africanos y no una variante patogénica (Kapa y cols., 2009).

Un hallazgo sorprendente fue que la hermana **II.3** del probando porta las mismas mutaciones que el sobrino **III.2** y no presentó un fenotipo de SQT. Este miembro padece lupus eritematoso sistémico, con una disminución moderada en la función renal que da lugar a la presencia de una ligera hiperpotasemia que podría estar enmascarando un posible diagnóstico de SQT. Es posible que el aumento de la concentración plasmática de K^+ producido en esta paciente cause un aumento en la amplitud de la corriente generada por los canales hERG (Compton y cols., 1996). Curiosamente, lo que predice la ecuación de Nerst para un canal iónico selectivo para el K^+ es que al aumentar la $[K^+]_e$ disminuye la diferencia con la $[K^+]_i$ y la fuerza electromotriz y, por tanto, la amplitud de la corriente debería ser menor. Sin embargo, se ha descrito que en los canales hERG el aumento de la $[K^+]_e$ favorece la ocupación de un sitio de unión para el K^+ localizado en la boca extracelular del canal hERG. La ocupación de dicho sitio de unión, determinado por la serina 631 (equivalente a la treonina 449 en canales Shaker) causa un cambio conformacional que reduce la velocidad de la inactivación tipo-C de estos canales y que es responsable, en último término, del aumento de la I_{Kr} y del acortamiento del intervalo QT (Tamargo y cols., 2004). De hecho, los suplementos de K^+ constituyen una de las estrategias terapéuticas que pueden utilizarse en estos pacientes (Compton y cols., 1996; Choy y cols., 1997; Etheridge y cols., 2003; Kapoor, 2008).

1.1. La mutación p.T152HfsX180 en los canales hERG, por sí sola, no es responsable del desarrollo de SQT

Como se ha mencionado, la variante hERG p.T152HfsX180 da lugar a una proteína truncada de 332 aminoácidos, de los cuales, únicamente los primeros 152 se corresponden con la secuencia original del canal. Es de destacar que en esta región conservada del extremo N-terminal se incluye el dominio PAS que juega un papel importante en la regulación de la expresión y algunas propiedades biofísicas del canal. El análisis funcional de la mutación hERG p.T152HfsX180 demostró que, como era de esperar, la transfección del ADNc que codifica hERG p.T152HfsX180

en células CHO no generó ningún tipo de corriente. Para simular la condición heterocigótica de los portadores de la mutación (probando y hermanas **II.1** y **II.6**), hicimos experimentos en los que se coexpresó hERG p.T152HfsX180 y WT en proporción 1:1 en células CHO. Sorprendentemente, en estas condiciones se observaba un aumento de la I_{hERG} registrada. Idénticos resultados se obtuvieron al expresar el ADNc codificando los canales hERG p.T152HfsX180 en células HL-1 las cuales expresan canales hERG de forma endógena. De hecho, en células HL-1 la expresión de la proteína truncada produjo un aumento de la I_{Kr} “dependiente de concentración”, es decir, a mayor cantidad de ADNc transfectado, mayor fue el aumento producido, lo que demuestra la especificidad del efecto. A consecuencia de este aumento, observamos que la densidad de la I_{hERG} generada en células CHO por la transfección en heterocigosis de canales hERG WT + hERG p.T152HfsX180 no fue diferente de aquella generada por la transfección en homocigosis de canales hERG WT. Es más, la presencia conjunta de ambas formas no modificó la morfología de los PAs simulados mediante un modelo matemático de PA ventricular humano.

En el año 2009, Gustina y Trudeau demostraron en oocitos de ranas del género *Xenopus* que la presencia de fragmentos de subunidades hERG incluyendo los residuos 1 a 135 del extremo N-terminal (dominio PAS), era suficiente para restaurar el proceso de deactivación en canales hERG con diversas mutaciones (Y43A o R56Q) en el extremo N-terminal asociadas con el desarrollo de SQT (Gustina y Trudeau, 2009). Como se ha descrito en el apartado de Introducción, el dominio PAS juega un papel crucial en el proceso de deactivación de los canales hERG gracias a la interacción con la región *linker* que une los segmentos S4 y S5 y con el dominio CNBHD del extremo C-terminal de cada una de las subunidades que forman el canal (**Figura VI.1**) (Gustina y Trudeau, 2011; Barros y cols., 2012; Gustina y Trudeau, 2012; Morais-Cabral y Robertson, 2015). En nuestro caso, hemos descrito por primera vez la existencia de una nueva función del extremo N-terminal de los canales hERG al observar que el péptido hERG p.T152HfsX180, por sí solo, es capaz de ejercer un *efecto chaperona* sobre canales WT. En este contexto, sería interesante analizar el mecanismo responsable de este *efecto chaperona* producido por el péptido, así como identificar la secuencia responsable del mismo. En base a resultados previos obtenidos por nuestro grupo en otros canales, proponemos que la secuencia responsable formaría parte del extremo N-terminal nativo del canal hERG.

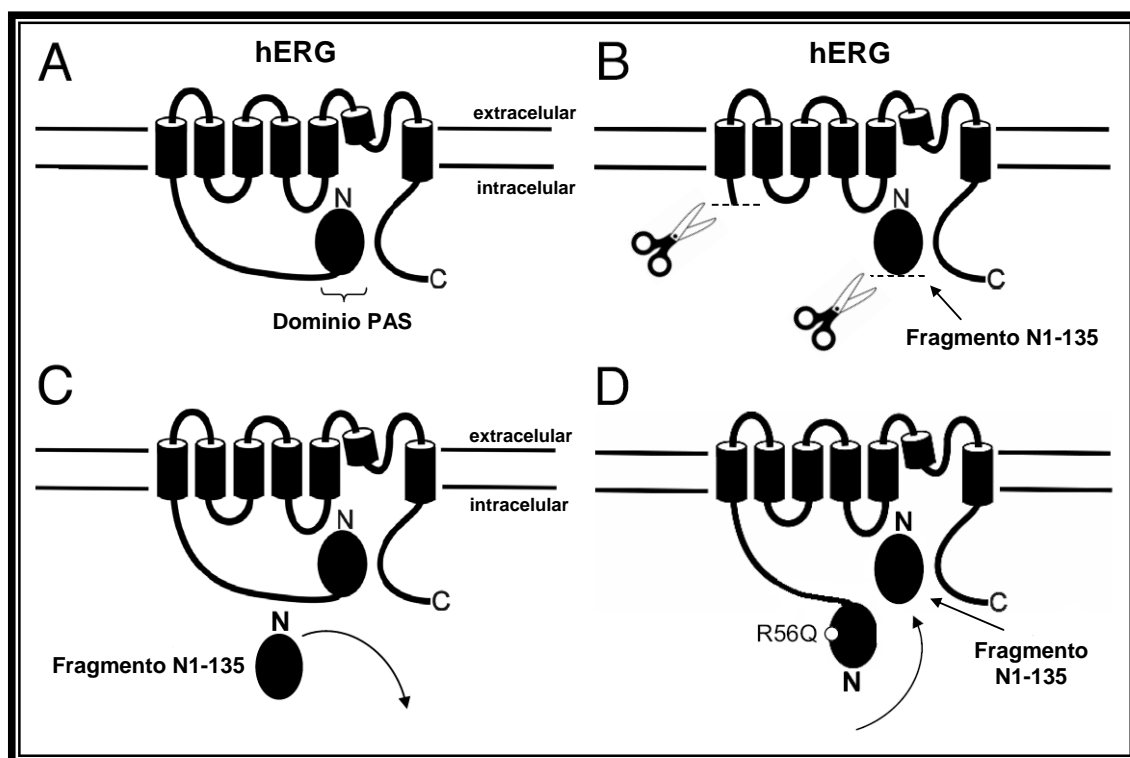


Figura VI.1. Representación esquemática de la interacción entre el fragmento correspondiente al dominio PAS (aminoácidos 1 al 135) con los canales hERG. En la figura sólo se representa una de las cuatro subunidades que forman el canal. (A) Interacción del dominio PAS de una subunidad hERG con la región *linker* que une los segmentos S4 y S5 y el dominio CNBHD de la misma subunidad. (B) La interacción del dominio PAS con el resto del canal no requiere de la presencia del dominio N-proximal (C) Los fragmentos del dominio PAS solubles no son capaces de suplantar al dominio PAS de canales hERG WT. (D) Los fragmentos del dominio PAS solubles rescatan la función de dominios PAS que presentan mutaciones de pérdida de función (R56Q) asociadas al desarrollo de SQT y que son incapaces de interaccionar con las respectivas regiones de la subunidad hERG. [Adaptada de Gustina y Trudeau, 2009]

De hecho, además de en los canales hERG, otros autores ya habían propuesto la posible existencia de un *efecto chaperona* en otros canales iónicos cardiacos. En el año 2012, Clatot y colaboradores presentaron unos experimentos muy preliminares que sugerían que el péptido que forma el dominio N-terminal de los canales de sodio Nav1.5 (de 132 aminoácidos) era capaz de aumentar la densidad de la I_{Na} registrada en células HEK que habían sido cotransfectadas con los canales Nav1.5 y el dominio N-terminal. Estos autores no describieron ni los mecanismos ni los determinantes moleculares de este efecto, aunque especulaban con la posibilidad de que dicho péptido pudiera actuar como un señuelo que favorecería que un mayor número de canales Nav1.5 superasen el sistema de control de calidad celular y alcanzasen la membrana plasmática (Clatot y cols., 2012). Nuestro grupo demostró 4 años más tarde que el fragmento N-terminal de los canales de sodio Nav1.5 aumenta tanto la I_{Na} como la I_{K1} registradas en miocitos ventriculares de rata al ejercer un *efecto chaperona* sobre los canales que generan dichas corrientes a nivel ventricular (Matamoras y cols., 2016). Dicho efecto era debido a que el extremo N-terminal del canal Nav1.5

presenta un sitio de interacción con proteínas que presentan dominios PDZ, como la α 1-sintrofina en el que es crítica la presencia de la serina en posición 20.

A partir de estos resultados, sería interesante profundizar en el estudio de los determinantes moleculares y los mecanismos responsables del *efecto chaperona* producido por el péptido hERG p.T152HfsX180.

Es importante destacar que el análisis funcional de la mutación p.T152HfsX180 en los canales hERG ha demostrado que la densidad de la I_{Kr} generada al coexpresar los canales WT con los mutados (condición de los portadores), es idéntica a la generada cuando se expresan los canales WT en solitario. Este resultado sugiere que la mutación p.T152HfsX180 en los canales hERG, por sí sola, podría no ser responsable de la aparición de SQTl en la familia estudiada.

2. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN Tbx20 p.R311C

El probando **II:4**, sus hermanas **II:3** y **II:6**, y su sobrino **III:2**, portan una mutación de cambio de sentido en heterocigosis en el gen *TBX20* (NM_001077653.2:c.931C>T) que codifica el factor de transcripción Tbx20 p.R311C. El análisis bioinformático mediante la utilización de diversos predictores que consideran la posición y el cambio de aminoácido entre otras cosas, nos indicó que dicha variante era altamente patogénica. Diversos estudios han identificado numerosas mutaciones en heterocigosis en el gen *TBX20* asociadas al desarrollo de cardiopatías congénitas que cursan con anomalías en el septo interauricular e interventricular, CMD, alteraciones en el sistema valvular, FOP, DVPAT, tetralogía de Fallot, defectos del septo auriculoventricular y/o pentalogía de Fallot (Kirk y cols., 2007; Liu y cols., 2008; Qian y cols., 2008; Posch y cols., 2010; Mittal y cols., 2016; Ghosh y cols., 2017; Huang y cols., 2017). De hecho, Tbx20 es un factor de transcripción que juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica durante la organogénesis embrionaria en vertebrados, incluyendo el desarrollo del corazón, sistema nervioso y las diferentes extremidades (Meins y cols., 2000). Dicha función la lleva a cabo gracias a la presencia en su estructura de un dominio T-box que permite su interacción con regiones específicas del ADN y de dominios de transactivación y transrepresión que modulan dicha interacción, lo que permite activar o inhibir, respectivamente, la expresión de los diferentes genes de una manera perfectamente controlada y ordenada. No obstante, cabe destacar que en este proceso no sólo participa Tbx20 sino que éste va a actuar en combinación y de manera jerárquica con diversos cofactores y factores de transcripción involucrados igualmente en el desarrollo cardíaco (Stennard y cols., 2003; Plageman y Yutzey, 2005; Kaltenbrun y cols., 2013). Por todo ello, cabría esperar que aquellos miembros de la familia que portan la mutación en Tbx20 presentasen algún tipo de anomalía estructural cardíaca.

Sin embargo, la localización de la mutación p.R311C en el dominio transactivador y no en el dominio T-box del factor, responsable de su unión al ADN en la mayor parte de los genes diana que participan en la cardiogénesis, podría explicar, al menos en parte, la ausencia de defectos estructurales cardíacos en los portadores de la misma.

Cabe destacar que estudios previos ya habían confirmado que, en animales como el ratón o moscas del género *Drosophila*, Tbx20 es un determinante clave no solo en el desarrollo cardíaco sino también en la regulación de la función cardíaca adulta (Qian y cols., 2008; Shen y cols., 2011). De esta manera, se ha demostrado que en moscas adultas en las que se suprime el gen que codifica el factor neuromancer (*nmr2*; ortólogo invertebrado de Tbx20) desarrollan alteraciones cardíacas que incluyen anomalías en el patrón de contracción, visibles por la presencia de bradicardia y latidos irregulares/arritmias, así como anomalías en la estructura fibrilar que compone el tejido muscular cardíaco. Por su parte, en corazones de ratones adultos *knockout* para el gen *Tbx20* se ha observado que existen claras diferencias dependiendo si la ausencia de expresión del factor se produce en homocigosis (pérdida de función de los dos alelos del gen) o en heterocigosis (pérdida de función de sólo uno de los alelos). En homocigosis se observa el desarrollo de una cardiomiopatía grave que causa la muerte precoz del animal (Shen y cols., 2011), mientras que cuando se suprime sólo uno de los dos alelos, se observa la aparición de CMD con defectos en la formación del sistema valvular y anomalías en el proceso de septación (Kirk y cols., 2007).

2.1. Tbx20 WT, pero no Tbx20 p.R311C, regula los niveles de expresión del gen *KCNH2* en el miocardio adulto humano

El análisis funcional del efecto de Tbx20 sobre las diferentes corrientes iónicas implicadas en el PA ventricular humano nos permitió demostrar que dicho factor, tanto en su forma WT como p.R311C, no es capaz de regular la expresión de los canales iónicos responsables de la I_{Ks} , I_{Na} e I_f en células HL-1 o la I_{K1} en miocitos ventriculares de rata. Realizamos un estudio exhaustivo de la presencia del sitio consenso de unión de Tbx20 a las regiones promotoras de los genes que codifican diversos canales iónicos y proteínas reguladoras en el hombre y en el ratón. En el caso de la I_{Na} , I_f o I_{K1} la ausencia de efecto podría explicarse por el hecho de que los promotores de los genes que codifican la expresión de estos canales tanto en el ratón como en el hombre carecen del sitio consenso de unión para Tbx20.

Con respecto a la I_{Ks} , cabe destacar que los resultados obtenidos en el WB demostraron que ambas formas de Tbx20 aumentaron significativamente la expresión de la proteína auxiliar minK. En el miocardio adulto humano, los canales que generan la I_{Ks} están formados por el ensamblaje de

cuatro subunidades α Kv7.1 junto con dos subunidades auxiliares minK (Sanguinetti y cols., 1996; Chen y cols., 2003). Éstas últimas modulan la corriente generada por los canales, aumentando la conductancia de las subunidades Kv7.1 (Sesti y Goldstein, 1998). Por tanto, cabría esperar que el aumento en minK estuviese acompañado de un aumento de la I_{Ks} . Sin embargo, Xu y colaboradores demostraron que la proteína minK puede actuar como una chaperona endocítica, favoreciendo la internalización de complejos Kv7.1-minK y controlando con ello la expresión neta de canales en la membrana así como la densidad de la I_{Ks} (Xu y cols., 2009). Esta acción dual podría explicar el hecho de que el aumento en minK no se acompañe de un cambio en la densidad de la I_{Ks} .

Por otro lado, demostramos que Tbx20, tanto WT como p.R311C, aumentó significativamente la $I_{Ca,L}$ generada en células HL-1, confirmando estudios previos en el miocardio adulto de ratón que demuestran que dicho factor es capaz de aumentar la expresión de los canales de calcio Cav1.2 y, por tanto, la corriente generada por ellos (Shen y cols., 2011). Este aumento sería consecuencia de la interacción de Tbx20 con el promotor del gen *Cacna1c* en el ratón que, tal y como hemos demostrado en el análisis bioinformático realizado, presenta la secuencia consenso de unión para Tbx20. Sin embargo, Tbx20 fue incapaz de modificar la $I_{Ca,L}$ registrada en hiPSC-CMs, resultado que concuerda con el hecho de que el promotor del gen humano *CACNA1C*, codificando los canales Cav1.2, no presenta la secuencia consenso de unión para este factor.

Nuestros resultados demuestran en primicia que Tbx20 es capaz de ejercer un efecto pro-transcripcional sobre el gen *KCNH2*, aumentando significativamente la expresión de canales hERG así como la I_{Kr} registrada tanto en células HL-1 como en hiPSC-CMs. Este hecho concuerda con la presencia del sitio consenso de unión de Tbx20 al promotor del gen *KCNH2* en ratón y en el hombre. Es importante destacar que hemos demostrado que en el miocardio adulto Tbx20 regula de forma específica la expresión de estos canales, sin afectar la de otros canales que también participan en la génesis del PA ventricular. Estos resultados tienen una gran relevancia considerando que la I_{Kr} es la principal corriente responsable de la fase 3 de la repolarización ventricular humana, por lo que juega un papel crítico en el control de la DPA y del periodo refractario. De hecho, tal como se ha mencionado anteriormente, mutaciones de ganancia o pérdida de función en el gen *KCNH2* causan síndrome de QT corto o síndrome de QT largo, respectivamente (Sanguinetti, 2010; Abriel y Zaklyazminskaya, 2013; Smith y cols., 2016).

El análisis funcional de la mutación p.R311C en Tbx20 demostró que dicho mutante no sólo no aumentaba la expresión de los canales y la densidad de la I_{Kr} sino que la disminuía. Sin embargo, en experimentos de luciferasa pudimos observar que a pesar de que p.R311C Tbx20 carecía completamente de actividad pro-transcripcional sobre el promotor del gen *KCNH2*, no produjo una disminución de dicha actividad. Para tratar de explicar este resultado, realizamos experimentos de

luciferasa en los que determinamos el efecto de la cotransfección (Tbx20 WT + p.R311C) sobre la actividad transcripcional del promotor del gen *KCNH2*. En dichos experimentos pudimos observar que en presencia de la forma mutada del factor, se reduce el efecto pro-transcripcional de la forma WT, es decir, podríamos concluir que la forma mutada está actuando como un antagonista competitivo de la forma WT.

En hiPSC-CMs la variante Tbx20 p.R311C prolongó significativamente la DPA como consecuencia de la disminución producida sobre la I_{Kr} . Es de destacar que la prolongación de la DPA fue significativamente mayor a frecuencias cardiacas lentas. Este fenómeno es muy característico del SQT2 (Skinner y cols., 2019), en el que la bradicardia exagera la prolongación de la DPA y es uno de los desencadenantes de eventos arrítmicos en estos pacientes.

Al igual que sucede en el miocardio en desarrollo, se ha sugerido que en el corazón adulto de diferentes especies, incluido el hombre, Tbx20 no va a actuar de forma aislada sino en combinación con otros factores formando lo que se denomina una cohorte transcripcional, que será la encargada de regular la expresión de genes que participan en el control del funcionamiento de dicho órgano. En el caso de Tbx20 se ha demostrado su interacción funcional con el factor potenciador específico de miocitos 2A (Mef2A o *myocyte-specific enhancer factor 2A*), Tead1, el factor relacionado con el receptor de estrógenos (Esrr o *estrogen receptor-related receptor*) y Creb1 (*cAMP responsive element binding protein 1*), los cuales, a su vez, van a responder a estímulos como la concentración intracelular de Ca^{2+} , los contactos célula-célula, diferentes estímulos electrofisiológicos, el ritmo circadiano, el metabolismo energético y los niveles de AMPc intracelulares (**Figura VI.2**) (Shen y cols., 2011). Diversos estudios han demostrado que los factores de transcripción cardiacos, además de unirse entre sí formando diferentes complejos, pueden unirse por separado a secuencias consenso en el ADN muy similares y/o muy próximas entre sí (separadas por 500 pb o menos). De hecho, en el modelo propuesto por Shen y colaboradores se sugiere que, a diferencia de lo que sucede durante la cardiogénesis, en el miocardio adulto Tbx20 no regula la expresión génica interaccionando físicamente con el resto de factores que forman la cohorte sino que, por el contrario, cada uno de ellos va a unirse a diferentes secuencias consenso situadas consecutivamente dentro de la región promotora de los respectivos genes diana (**Figura VI.2**) (Shen y cols., 2011). Así, la unión de un factor u otro dependerá de los diferentes grados de afinidad que éstos posean por su respectivo sitio de interacción con el ADN.

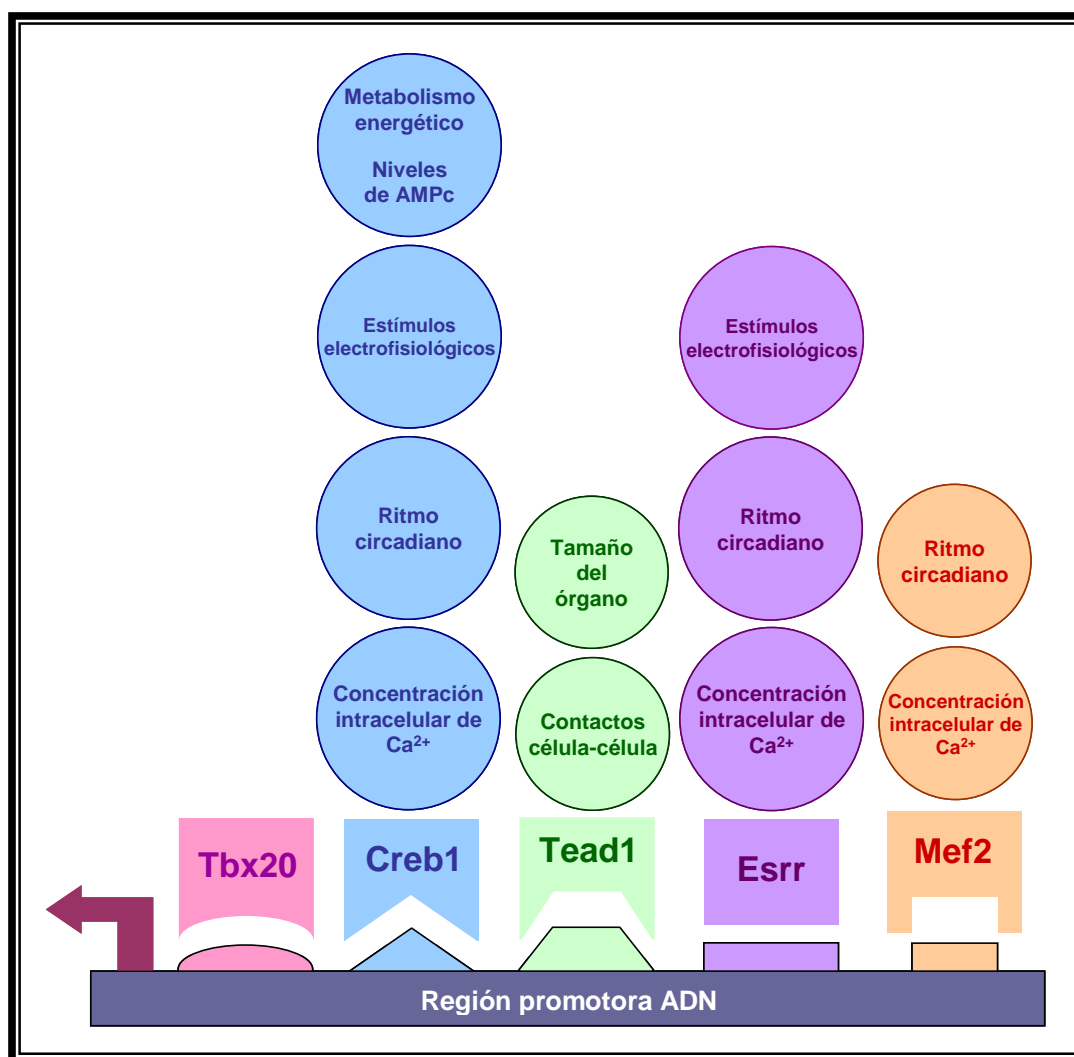


Figura VI.2. Tbx20 regula la expresión génica en el miocardio adulto humano gracias a la formación de una cohorte transcripcional con otras proteínas que incluyen el factor potenciador específico de miocitos 2A (Mef2A), Tead1, el factor relacionado con el receptor de estrógenos (Esrr) y Creb1. Estos factores van a unirse por separado a diferentes secuencias consenso localizadas muy próximas entre sí en la región promotora de los diferentes genes diana a los que regulan. A su vez, dichos factores van a ser regulados por diferentes estímulos como la concentración intracelular de Ca^{2+} , el tamaño del órgano, los contactos célula-célula, diferentes estímulos electrofisiológicos, el ritmo circadiano, el metabolismo energético y los niveles de AMPc intracelulares. [Adaptada de Shen y cols., 2011]

Por tanto, es posible que la expresión del gen *KCNH2* esté regulada por Tbx20 en combinación con el resto de factores que conformarían la cohorte transcripcional en el miocardio adulto humano. Si así fuera, podría ser que la mutación en Tbx20 además de afectar directamente a la transcripción de este gen como demuestran nuestros experimentos de luciferasa, estuviera comprometiendo la capacidad de dicho factor para coordinar las respuestas adaptativas que la cohorte pone en marcha con el fin de regular correctamente la expresión del gen. Esto podría dar lugar a que algunos portadores de la mutación presenten un fenotipo leve en condiciones basales, pero que pudiera agravarse ante situaciones más demandantes en las que el miocardio no va a lograr

adaptarse, como por ejemplo ante un aumento del tono simpático o la prolongación de la repolarización ventricular inducida por fármacos u hormonas (como sería la realización del test de adrenalina). De hecho, en la hermana **II:6** del probando dicho síndrome se diagnostica de SQT2 en base a esta última prueba. Asimismo, en otros miembros de la familia como el sobrino **III:2**, estos análisis podrían ser de gran utilidad ya que, a pesar de que dicho sujeto no se diagnosticara inicialmente con SQT2, presenta un alto riesgo de desarrollar posibles episodios de síncope o MSC durante la etapa adulta debido a la combinación genética (*heterocigosis digénica*) que presenta (Giudicessi y Ackerman, 2013). Es más, sabiendo que Tbx20 p.R311C es incapaz de ejercer un efecto pro-transcripcional sobre el gen *KCNH2*, podría ser que en este sujeto la epilepsia estuviese siendo desencadenada por la presencia conjunta de este mutante con hERG p.Q1068R.. De hecho, diversos estudios han demostrado que Tbx20 no solo es expresado a nivel cardiaco sino también durante el desarrollo del sistema nervioso en embriones de ratón y humanos (Meins y cols., 2000; Kraus y cols., 2001; Song y cols., 2006; Song y cols., 2015). Más aún, se ha confirmado que en el humano Tbx20 se encuentra fundamentalmente implicado en la diferenciación de las neuronas motoras craneales localizadas en la parte cerebral posterior y en la región cervical de la médula espinal (Song y cols., 2006).

Los resultados del análisis genotipo-fenotipo conjuntamente con los obtenidos mediante el análisis funcional nos permiten concluir que la presencia simultánea de las mutaciones en *KCNH2* y en *TBX20* contribuiría a la prolongación del intervalo QT responsable del desarrollo de SQT2 en esta familia.

3. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA VARIANTE c.-66A>G EN EL GEN *KCNN3*

El probando, la hermana **II:6** y el sobrino **III:1** portan una mutación (c.-66A>G) en la región promotora del gen *KCNN3*, que codifica los canales de potasio de baja conductancia activados por Ca^{2+} tipo 3 (SK3). Estos canales son activados durante la contracción del músculo cardiaco, en respuesta al aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, generando una corriente de salida de K^+ que repolariza la membrana de los cardiomiocitos y acorta con ello la DPA (Chang y Chen, 2015). A pesar de que estos canales se encuentran localizados tanto en aurículas como ventrículos (Xu y cols., 2003; Tuteja y cols., 2005; Tuteja y cols., 2010), los datos funcionales sugieren que en condiciones fisiológicas participan fundamentalmente en el proceso de repolarización auricular (Nagy y cols., 2009; Skibsbbye y cols., 2014; Zhang y cols., 2014). Cabe destacar que la mutación

presenta una penetrancia incompleta en la familia, ya que de los tres portadores de la variante sólo dos (la hermana **II:6** y el probando) presentan un fenotipo de SQTl.

3.1. La mutación c.-66A>G en la región promotora del gen *KCNN3* no es responsable del desarrollo de SQTl

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de luciferasa en células HL-1 demuestran que la mutación c.-66A>G en el promotor del gen *KCNN3* suprime completamente la transcripción de éste por parte de SP1 que fue el factor de transcripción que se utilizó como control positivo. Por otra parte, en el análisis bioinformático identificamos la presencia de la secuencia consenso de unión para Tbx20 en el promotor de *KCNN3*. Por este motivo, realizamos ensayos de luciferasa para analizar si Tbx20 también regula la actividad transcripcional de dicho promotor y, en caso de que la hubiera, si la mutación p.R311C Tbx20 estaría afectando dicha regulación. Los ensayos de luciferasa demostraron que Tbx20 WT, pero no p.R311C, ejercía un efecto pro-transcripcional sobre la forma nativa del promotor del gen *KCNN3*. Cuando se realizaron los ensayos utilizando la forma mutada del promotor (c.-66A>G), ninguna de las dos formas de Tbx20 fue capaz de regular la expresión de dicho gen. Estos resultados sugerirían que los portadores de ambas mutaciones en heterocigosis (p.R311C en Tbx20 y c.-66A>G en el promotor de *KCNN3*) presentarán una haploinsuficiencia de *KCNN3* y por tanto una disminución de la expresión de los canales SK3. Sin embargo, el análisis funcional realizado en células CHO con el fin de determinar el grado de participación de la corriente generada por los canales SK3 durante el desarrollo de un PA ventricular cardiaco, demostró que la dependencia de tiempo de la conductancia de los canales era idéntica a la de la morfología del PA, sugiriendo que la relación de la conductancia con el potencial de membrana era lineal. Es decir, y como se había descrito previamente en la literatura, nuestros resultados apoyarían la hipótesis de que en condiciones fisiológicas los canales SK3 no van a participar en el proceso de repolarización ventricular. De hecho se había descrito que la apamina (un bloqueante selectivo de canales SK3) no modifica la DPA en muestras de preparaciones multicelulares tanto auriculares como ventriculares de diferentes especies, incluyendo el hombre (Nagy y cols., 2009; Chang y Chen, 2015). Por tanto, estos hallazgos sugerirían que la mutación c.-66A>G en la región promotora del gen *KCNN3* no es responsable de la prolongación de la DPA ventricular implicada en la aparición de SQTl en la familia objeto de estudio.

4. IMPLICACIONES CLÍNICAS

Se ha demostrado que el SQTl está caracterizado por una baja penetrancia y una amplia variabilidad fenotípica en aquellas familias diagnosticadas con la enfermedad (Priori y cols., 1999; Giudicessi y Ackerman, 2013). Estas características se observan en los miembros de la familia estudiada en los que el fenotipo varió desde un grado medio desarrollado en el probando hasta un fenotipo más grave con manifestaciones clínicas importantes en la hermana **II:1**. La variabilidad fenotípica en el SQTl puede explicarse no sólo por la presencia de parámetros demográficos tales como el género o la edad del individuo, sino también por la existencia de “modificadores genéticos” adicionales como SNPs (Napolitano y cols., 2015) o la presencia de posibles combinaciones entre mutaciones de diferentes genes (*heterocigosis digénica*), o alelos de un mismo gen (*heterocigosis compuesta*), que dan lugar a fenotipos patológicos de diversa gravedad (Westenskow y cols., 2004; Lin y cols., 2008; Wilde, 2010; Napolitano y cols., 2015). Es importante destacar que todas estas condiciones convergen en nuestra familia española.

4.1. La presencia conjunta de las mutaciones p.T152HfsX180 en los canales hERG y p.R311C en el factor Tbx20 favorece el desarrollo de SQTl

Tanto el probando **II:4** como la hermana **II:6** presentan *heterocigosis digénica* al portar la mutación p.T152HfsX180 en los canales hERG y p.R311C en Tbx20. Como bien hemos descrito, la mutación p.T152HfsX180 en los canales hERG, por sí sola, no parece responsable del desarrollo de SQTl. Por su parte, hemos demostrado que Tbx20 p.R311C no va a ser capaz de ejercer un efecto pro-transcripcional sobre el gen *KCNH2* pero sí que es capaz de unirse al promotor de éste, de hecho, va a competir con Tbx20 WT por dicha unión. Esto significa que la actividad transcripcional ejercida por Tbx20 WT, si suponemos que la relación entre ambas formas del factor es 1:1 y que se unen con la misma afinidad al ADN, debería disminuir aproximadamente a la mitad en relación a aquellos sujetos que no portan la mutación, disminuyendo con ello los niveles de expresión de los canales hERG, tanto su forma WT como p.T152HfsX180. Nuestros resultados obtenidos, tanto en células HL-1 como en hiPSC-CMs, así lo confirman. Aun así, la presencia de este fenómeno, por sí solo, no es responsable del desarrollo de SQTl. Los resultados de la presente Tesis Doctoral demuestran que hace falta más de un “*hit*” o mutación para dar lugar al desarrollo de SQTl en los miembros de la familia estudiada. Así pues, la presencia conjunta de las mutaciones p.R311C en Tbx20 y p.T152HfsX180 en los canales hERG es la responsable de disminuir la cantidad de canales hERG expresados a nivel de membrana de tal manera que la I_{Kr} generada sea de una magnitud al

menos dos veces menor que la generada en aquellos sujetos no portadores de dichas variantes. La presencia de ambas mutaciones, por tanto, es la responsable de generar el fenotipo de SQTl tanto en el probando como en la hermana **II:6**.

5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El estudio presenta una serie de limitaciones que pueden ser comunes a cualquier estudio experimental de esta naturaleza. La aproximación experimental ideal hubiese sido utilizar los hiPSC-CMs para analizar funcionalmente los efectos producidos por Tbx20, tanto WT como p.R311C, no sólo sobre la I_{Kr} sino sobre todas las corrientes cardiacas responsables del desarrollo de la fase de repolarización del PA ventricular humano. Sin embargo, la complejidad de los procesos de diferenciación, maduración y manejo de las mismas limita el acceso a este tipo de células. De todas formas, la gran mayoría de los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido obtenidos en diversos modelos celulares que incluyen sistemas heterólogos de expresión, una línea celular inmortal de origen murino auricular (HL-1) y los hiPSC-CMs. También habría sido interesante analizar los efectos de ambas formas de Tbx20 sobre cardiomiocitos diferenciados desde hiPSCs derivadas directamente de cada uno de los miembros de nuestra familia objeto de estudio. Esto último nos habría permitido analizar el impacto y las consecuencias de cada una de las variantes identificadas en un contexto fisiológico lo más parecido posible a lo que verdaderamente ocurre en cada uno de los sujetos. Sin embargo, es importante destacar que todos los modelos experimentales utilizados son perfectamente válidos y permiten reproducir las consecuencias electrofisiológicas de las mutaciones identificadas en los distintos portadores.

En la presente Tesis Doctoral demostramos, por primera vez, que el factor de transcripción regula la expresión del gen *KCNH2* en el miocardio adulto y, en consecuencia, participa en el control de la repolarización ventricular en el hombre. De hecho, mutaciones en el gen *TBX20* que comprometen esta regulación, dan lugar a la aparición de SQTl2. Por ello, el gen *TBX20* puede considerarse un gen asociado a SQTl o bien un “gen modificador” que contribuye a la disminución de la reserva repolarizante miocárdica y con ello a la aparición de SQTl. La posible implicación de las futuras variantes en *TBX20* en el pronóstico, penetrancia y variabilidad fenotípica del SQTl identificadas en familias que sean diagnosticadas con la enfermedad merece un análisis posterior más profundo.

VII. Conclusiones

Los resultados obtenidos en la presente **TESIS DOCTORAL** nos permiten concluir:

1. En el caso índice de una familia con SQTl tipo 2 identificamos mediante métodos de secuenciación masiva tres mutaciones en heterozigosis (p.T152HfsX180, p.R311C y c.-66A>G) que afectan a los canales hERG, al factor de transcripción Tbx20 y a la región promotora del gen *KCNN3*, respectivamente.
2. La mutación con desplazamiento del marco de lectura (p.T152HfsX180) de los canales hERG no modifica la densidad de la I_{Kr} en células HL-1 ni la duración de los PAs ventriculares humanos generados por un modelo matemático. De hecho, el péptido hERG p.T152HfsX180 ejerce un *efecto chaperona* sobre los canales hERG WT aumentando la expresión de éstos.
3. El factor de transcripción Tbx20 ejerce un efecto pro-transcripcional sobre el gen *KCNH2* humano lo que aumenta la expresión de canales hERG y la I_{Kr} generada por éstos en hiPSC-CM. De hecho, la sobreexpresión de Tbx20 abrevia la duración de los PAs registrados en estos cardiomiocitos.
4. Por el contrario, Tbx20 p.R311C es incapaz de ejercer dicho efecto pro-transcripcional disminuyendo de forma significativa la expresión de los canales hERG y de la I_{Kr} . Esta disminución de la I_{Kr} prolonga significativamente la duración de los PAs registrados en hiPSC-CM.
5. Ni la forma nativa ni la mutada de Tbx20 regulan la expresión de los canales iónicos que generan las corrientes despolarizantes I_{Na} e $I_{Ca,L}$ y las corrientes de K I_{Ks} , I_f , e I_{K1} .
6. La mutación c.-66A>G en la región promotora del gen *KCNN3* suprime completamente la transcripción del gen. Sin embargo, dado que el papel fisiológico de los canales SK3 en la repolarización de los PAs ventriculares humanos es cuando menos desconocido, parece poco probable que esta mutación fuera la responsable de la prolongación de la DPA implicada en la aparición de SQTl en la familia estudiada.
7. La presencia conjunta de las mutaciones p.R311C en Tbx20 y p.T152HfsX180 en los canales hERG sería responsable del SQTl del caso índice y del resto de miembros de la familia.

8. Por tanto, el gen *TBX20* puede considerarse un gen asociado a SQTl o bien un “gen modificador” cuyas mutaciones podrían contribuir a la disminución de la reserva repolarizante miocárdica y, con ello, a la aparición de SQTl.

VIII. Abreviaturas

τ : Constante de tiempo (ms)
 Ω : Ohmio; Unidad de resistencia eléctrica
4-AP: 4-aminopiridina
Ac: Anticuerpo
ACh: Acetilcolina
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
ADP: Adenosín difosfato
Aminoácido
A (Ala): Alanina
C (Cys): Cisteína
D (Asp): Ácido aspártico
E (Glu): Ácido glutámico
F (Phe): Fenilalanina
G (Gly): Glicina
H (His): Histidina
I (Ile): Isoleucina
K (Lys): Lisina
L (Leu): Leucina
M (Met): Metionina
N (Asn): Asparagina
P (Pro): Prolina
Q (Gln): Glutamina
R (Arg): Arginina
S (Ser): Serina
T (Thr): Treonina
V (Val): Valina
W (Trp): Triptófano
Y (Tyr): Tirosina
AMPc: Adenosin monofosfato cíclico
APA: Amplitud del PA
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP: Adenosín trifosfato
AV: Aurículo-ventricular
[Ca²⁺]_{ei}: Concentración extra/intracelular de Ca²⁺
CaM: Calmodulina
Cav1.2: subunidad α canales Ca²⁺ voltaje dependientes tipo L
CHO: Células de ovario de hámster chino

C_m: Capacitancia de la membrana celular
CMD: Cardiomiopatía dilatada
CMs: Cardiomiocitos
CNBHD (*cyclic nucleotide-binding homology domain*): Dominio del extremo C-terminal de canales hERG homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos
CNIC: Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III
Consorcio ITACA: Investigación Traslacional en Arritmias Cardiacas hereditarias
Creb1: *cAMP responsive element binding protein 1*
DAI (DCI): dispositivo automático implantable / dispositivo desfibrilador automático (*Implantable Cardioverter Defibrillator* o sus siglas ICD)
DPA: Duración del PA
DPA₂₀: duración del PA medida al 20% de la repolarización
DPA₅₀: duración del PA medida al 50% de la repolarización
DPA₉₀: duración del PA medida al 90% de la repolarización
DPP: Dipeptidilpeptidasa
DSCI: Denervación simpática cardíaca izquierda
DVPAT: Drenaje venoso pulmonar anómalo total
Eag: *Ether-a-go-go*
E_{Ba}: Potencial de inversión para el Ba²⁺
ECG: Electrocardiograma
EDN: Efecto dominante negativo
EEM: error estándar de la media
E_K: Potencial de inversión para el K⁺
E_m: Potencial de membrana
E_{Na}: Potencial de inversión para el Na⁺
Esrr: Factor relacionado con el receptor de estrógenos
FA: Fibrilación auricular
FOP: Foramen oval permeable
FV: Fibrilación ventricular
G: conductancia
GFP (*green fluorescent protein*): Proteína verde fluorescente

HDAC2: Histona deacetilasa tipo 2

HCN: Canales activados por la hiperpolarización regulados por nucleótidos cíclicos (*Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide-gated channels*)

hERG (*human ether-à-go-go related gene*).

También denominadas subunidades Kv11.1.

Subunidad α de los canales que generan I_{Kr}

hiPSC: *human induced pluripotent stem cell*

hiPSC-CM (*cardiomyocyte from human induced pluripotent stem cell*): Cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas humanas

HL-1: Línea celular procedente de linaje tumoral auricular murino

H_z: Hercio. Unidad de frecuencia

I_{Ba} : Corriente de Ba^{2+}

$I_{Ca,L}$: Corriente de entrada de Ca^{2+}

I_f : Corriente hiperpolarizante marcapasos (“*funny current*”)

I_{hERG} : Corriente generada en células CHO transfectadas con canales hERG

I_{K1} : Corriente de K^+ con rectificación interna

$I_{K,ACh}$: Corriente de salida de K^+ activada por ACh

$I_{K,ATP}$: Corriente de K^+ sensible a ATP

I_{Kr} : Corriente rectificadora tardía de salida de K^+ de activación rápida

I_{Ks} : Corriente rectificadora tardía de salida de K^+ de activación lenta

I_{Kur} : Corriente rectificadora tardía de salida de K^+ de activación ultrarrápida

I_{Na} : Corriente de entrada de Na^+

$I_{Na,L}$: Corriente tardía de entrada de Na^+

I_{SK3} : Corriente generada en células CHO transfectadas con canales SK3

I_{to1} : Corriente transitoria de salida de K^+ cardíaca

I_{to2} : Corriente transitoria de salida de Cl^- activada por Ca^{2+}

I-V: Relación intensidad de corriente-voltaje

JLN: Síndrome Jervell y Lange-Nielsen

k : Valor de la pendiente de la curva

$[K^+]_{ext}$: Concentración extra/intracelular de K^+

K_{ACh} : Canales de K^+ activados por ACh

K_{Ca} : Canales de K^+ activados por Ca^{2+}

KChAP: *K⁺ Channel-Associated Protein*

KChIP: *Kv Channel Interacting Protein*

kDa: kiloDalton. Unidad de masa atómica

Kir: Canales de K^+ rectificadores internos

Kv: Canales de K^+ dependientes de voltaje

LJP: *Liquid Junction Potencial*

lpm: Latidos por minuto

Mef2A: Factor potenciador específico de miocitos 2A

minK: *Minimal K⁺ channel subunit*

MOI: Multiplicidad de infección

MiRP: *MinK-Related Peptides*

ms: Milisegundos

MSC: Muerte súbita cardíaca

MTA1: Proteína asociada a metástasis tipo 1

mV: Milivoltios

Nav1.5: Subunidad α canales de Na^+ voltaje dependientes

Nedd4-2: proteína ubiquitin ligasa E3

NuRD: Complejo implicado en el remodelamiento del nucleosoma

pA: PicoAmperio. Unidad de amplitud de corriente

PA: Potencial de acción

PAS: Dominio del extremo N-terminal de canales hERG formado por secuencia “Per-Arnt-Sim”

pb: Pares de bases

PDM: potencial diastólico máximo

PDZ: Referido a dominio PDZ

(*Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and Zonula occludens-1 protein (zo-1)*)

pF: PicoFaradio; Unidad de capacidad eléctrica. Medida de la capacitancia celular

PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKA: Protein-quinasa dependiente de AMPc

PKC: Protein-quinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato

QTc : Intervalo QT corregido	SNPs (<i>single nucleotide polymorphism</i>): polimorfismo de un solo nucleótido
RBBP4/RBBP7 (<i>RB Binding Protein 4/7</i>): Proteínas de unión a histonas	SQTC : Síndrome QT Corto
RE : Retículo endoplásmico	SQTL : Síndrome QT Largo
RUVBL1/RUVBL2 (<i>RuvB-like 1/2</i>): Helicasas de ADN	SQTLc : SQTL congénito
RyR2 : Receptor de rianodina	SQTLa : Síndrome QT Largo adquirido
SA : Senoauricular	SRT : Síndrome de Repolarización Temprana o precoz
SAP : Síndrome arritmogénico primario	TEA : Tetraetilamonio
SBr : Síndrome de Brugada	TdP : <i>Torsade de pointes</i>
SEN : Señal de exportación nuclear	TLE1/TLE3 : Co-represores familia TLE/Groucho
shRNA : <i>Short hairpin RNA</i> . Referido a un tipo de ARN de interferencia utilizado para silenciar una determinada proteína	TM : Transmembrana
SIDS (<i>Sudden Infant Death Syndrome</i>): Síndrome de la muerte súbita del lactante	TV : Taquicardia ventricular polimórfica
SK3 : Subunidad α canal de K^+ de baja conductancia activado por Ca^{2+} tipo 3	TVPC : Síndrome de Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica
SLN : Señal de localización nuclear	V_h : Punto medio de la curva
SNC : Sistema nervioso central	V_{máx} : velocidad máxima de despolarización
	WB : <i>Western blot</i>
	WT (<i>wild-type</i>): Alelo normal, nativo, salvaje, de un gen

IX. Bibliografía

- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SAN. MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;**97**:175-187.
- Abriel H, Zaklyazminskaya EV. Cardiac channelopathies: genetic and molecular mechanisms. *Gene* 2013;**517**:1-11.
- Abu-Zeitone A, Peterson DR, Polonsky B, McNitt S, Moss AJ. Efficacy of different beta-blockers in the treatment of long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2014;**64**:1352-1358.
- Accili EA, Kiehn J, Yang Q, Wang Z, Brown AM, Wible BA. Separable $Kv\beta$ subunit domains alter expression and gating of potassium channels. *J Biol Chem* 1997;**272**:25824-25831.
- Ackerman MJ. The long QT syndrome. *Pediatr Rev* 1998;**19**:232-238.
- Ackerman MJ, Khositseth A, Tester DJ, Hejlik JB, Shen WK, Porter CB. Epinephrine-induced QT interval prolongation: a gene-specific paradoxical response in congenital long QT syndrome. *Mayo Clin Proc* 2002;**77**:413-421.
- Ackerman MJ, Mohler PJ. Defining a new paradigm for human arrhythmia syndromes: phenotypic manifestations of gene mutations in ion channel- and transporter-associated proteins. *Circulation research* 2010;**107**:457-465.
- Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, Camm AJ, Ellinor PT, Gollob M, Hamilton R, Hershberger RE, Judge DP, Le Marec H, McKenna WJ, Schulze-Bahr E, Semsarian C, Towbin JA, Watkins H, Wilde A, Wolpert C, Zipes DP. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm* 2011;**8**:1308-1339.
- Ackerman MJ. My approach to treatment of the congenital long QT syndromes. *Trends Cardiovasc Med* 2015;**25**:67-69.
- Adelman JP, Maylie J, Sah P. Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: form and function. *Annu Rev Physiol* 2012;**74**:245-269.
- Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM. Accessory $Kv\beta 1$ subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated K^{+} channels in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 2005;**96**:451-458.
- Aldrich RW. Fifty years of inactivation. *Nature* 2001;**411**:643-644.
- Alonso-Ron C, Barros F, Manso DG, Gomez-Varela D, Miranda P, Carretero L, Dominguez P, de la Pena P. Participation of HERG channel cytoplasmic structures on regulation by the G protein-coupled TRH receptor. *Pflugers Arch* 2009;**457**:1237-1252.
- Altmann HM, Tester DJ, Will ML, Middha S, Evans JM, Eckloff BW, Ackerman MJ. Homozygous/Compound Heterozygous Triadin Mutations Associated With Autosomal-Recessive Long-QT Syndrome and Pediatric Sudden Cardiac Arrest: Elucidation of the Triadin Knockout Syndrome. *Circulation* 2015;**131**:2051-2060.
- Altomare C, Pianezzi E, Cervio E, Bolis S, Biemmi V, Benzoni P, Camici GG, Moccetti T, Barile L, Vassalli G. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from cardiac progenitor cells: effects of selective ion channel blockade. *Europace* 2016;**18**:iv67-iv76.
- Amorós I, Jiménez-Jáimez J, Tercedor L, Barana A, Gómez R, de la Fuente MG, Dolz-Gaitón P, Alvarez M, Martínez-Espín E, Lorente JA, Melgares R, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2011;**8**:463-470.
- Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996;**491**:31-50.
- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 2000;**403**:553-556.
- Andersen TA, Troelsen Kde L, Larsen LA. Of mice and men: molecular genetics of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci* 2014;**71**:1327-1352.
- Anderson CL, Delisle BP, Anson BD, Kilby JA, Will ML, Tester DJ, Gong Q, Zhou Z, Ackerman MJ, January CT. Most LQT2 mutations reduce $Kv11.1$ (hERG) current by a class 2 (trafficking-deficient) mechanism. *Circulation* 2006;**113**:365-373.
- Anderson CL, Kuzmicki CE, Childs RR, Hintz CJ, Delisle BP, January CT. Large-scale mutational analysis of $Kv11.1$ reveals molecular insights into type 2 long QT syndrome. *Nature communications* 2014;**5**:5535.
- Anson BD, Ackerman MJ, Tester DJ, Will ML, Delisle BP, Anderson CL, January CT. Molecular and

functional characterization of common polymorphisms in HERG (KCNH2) potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**286**:H2434-2441.

Anumonwo JM, Horta J, Delmar M, Taffet SM, Jalife J. Proton and zinc effects on HERG currents. *Biophys J* 1999;**77**:282-298.

Anumonwo JMB, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:45-54.

Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991;**97**:973-1011.

Arcangeli A, Rosati B, Cherubini A, Crociani O, Fontana L, Ziller C, Wanke E, Olivetto M. HERG- and IRK-like inward rectifier currents are sequentially expressed during neuronal development of neural crest cells and their derivatives. *Eur J Neurosci* 1997;**9**:2596-2604.

Armstrong CM. Ionic pores, gates and gating currents. *Q Rev Biophys* 1974;**7**:179-210.

Armstrong CM. Sodium channel and gating currents. *Physiol Rev* 1981;**61**:644-682.

Armstrong CM, Bezanilla F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 1973;**242**:459-461.

Armstrong CM, Bezanilla F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* 1977;**70**:567-90.

Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, Vege A, Wang DW, Rhodes TE, George AL, Jr., Schwartz PJ. Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation* 2007;**115**:361-367.

Bähring R, Milligan CJ, Vardanyan V, Engeland B, Young BA, Dannenberg J, Waldschutz R, Edwards JP, Wray D, Pongs O. Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of Kvβ subunits. *J Biol Chem* 2001;**276**:22923-22929.

Baldini A. DiGeorge syndrome: an update. *Curr Opin Cardiol* 2004;**19**:201-204.

Balser JR, Nuss HB, Romashko DN, Marbán E, Tomaselli GF. Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. *J Gen Physiol* 1996;**107**:643-658.

Balser JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:599-613.

Banai S, Tzivoni D. Drug therapy for torsade de pointes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1993;**4**:206-210.

Bao L, Kefaloyianni E, Lader J, Hong M, Morley G, Fishman GI, Sobie EA, Coetzee WA. Unique properties of the ATP-sensitive K⁺ channel in the mouse ventricular cardiac conduction system. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011;**4**:926-935.

Barana A, Matamoros M, Dolz-Gaitón P, Pérez-Hernández M, Amorós I, Núñez M, Sacristán S, Pedraz Á, Pinto Á, Fernández-Avilés F, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Chronic atrial fibrillation increases microRNA-21 in human atrial myocytes decreasing L-type calcium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2014;**7**:861-868.

Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. KvLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the IKs cardiac potassium current. *Nature* 1996;**384**:78-80.

Baronas VA, Kurata HT. Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Front Physiol* 2014;**27**:5-325.

Barron MR, Belaguli NS, Zhang SX, Trinh M, Iyer D, Merlo X, Lough JW, Parmacek MS, Bruneau BG, Schwartz RJ. Serum response factor, an enriched cardiac mesoderm obligatory factor, is a downstream gene target for Tbx genes. *J Biol Chem* 2005;**280**:11816-11828.

Barros F, Gomez-Varela D, Vilorio CG, Palomero T, Giraldez T, de la Pena P. Modulation of human erg K⁺ channel gating by activation of a G protein-coupled receptor and protein kinase C. *J Physiol* 1998;**511**:333-346.

Barros F, Dominguez P, de la Pena P. Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating. *Front Pharmacol* 2012;**3**:49.

Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultz J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet* 1997;**15**:30-35.

Baukrowitz T, Yellen G. Modulation of K⁺ current by frequency and external [K⁺]: a tale of two inactivation mechanisms. *Neuron* 1995;**15**:951-960.

Bazett HC. An analysis of the time relations of electrocardiograms. *Heart* 1920;**7**:353-370.

- Bdier AY, Al-Ghamdi S, Verma PK, Dagriri K, Alshehri B, Jiman OA, Ahmed SE, Wilde AAM, Bhuiyan ZA, Al-Aama JY. Autosomal recessive long QT syndrome, type 1 in eight families from Saudi Arabia. *Molecular genetics & genomic medicine* 2017;**5**:592-601.
- Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989;**51**:367-384.
- Beeler GW, Reuter H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *J Physiol* 1977;**268**:177-210.
- Behr ER, Dalageorgou C, Christiansen M, Syrris P, Hughes S, Tome Esteban MT, Rowland E, Jeffery S, McKenna WJ. Sudden arrhythmic death syndrome: familial evaluation identifies inheritable heart disease in the majority of families. *Eur Heart J* 2008;**29**:1670-1680.
- Bendahhou S, Marionneau C, Haurogne K, Larroque MM, Derand R, Szuts V, Escande D, Demolombe S, Barhanin J. In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc Res* 2005; **67**:529-538.
- Benito B, Brugada R, Brugada J, Brugada P. Brugada syndrome. *Prog Cardiovasc Dis* 2008;**51**:1-22.
- Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL Jr. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* 1995;**376**:683-685.
- Bennett MT, Gula LJ, Klein GJ, Skanes AC, Yee R, Leong-Sit P, Chattha I, Sy R, Jones DL, Krahn AD. Effect of beta-blockers on QT dynamics in the long QT syndrome: measuring the benefit. *Europace* 2014;**16**:1847-1851.
- Bers DM, Pérez-Reyes E. Ca^{2+} channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:339-360.
- Bertaso F, Sharpe CC, Hendry BM, James AF. Expression of voltage-gated K^{+} channels in human atrium. *Basic Res Cardiol* 2002;**97**:424-433.
- Bérubé J, Chahine M, Daleau P. Modulation of HERG potassium channel properties by external pH. *Pflugers Arch* 1999;**438**:419-422.
- Betzenhauser MJ, Pitt GS, Antzelevitch C. Calcium Channel Mutations in Cardiac Arrhythmia Syndromes. *Curr Mol Pharmacol* 2015;**8**:133-142.
- Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000;**80**:555-592.
- Bezanilla F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 2002;**120**:465-473.
- Bezzina CR, Verkerk AO, Busjahn A, Jeron A, Erdmann J, Koopmann TT, Bhuiyan ZA, Wilders R, Mannens MM, Tan HL, Luft FC, Schunkert H, Wilde AA. A common polymorphism in KCNH2 (HERG) hastens cardiac repolarization. *Cardiovasc Res* 2003;**59**:27-36.
- Bian J, Cui J, McDonald TV. HERG $\text{K}(+)$ channel activity is regulated by changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Circ Res* 2001;**89**:1168-1176.
- Bianchi L, Shen Z, Dennis AT, Priori SG, Napolitano C, Ronchetti E, Bryskin R, Schwartz PJ, Brown AM. Cellular dysfunction of LQT5-minK mutants: abnormalities of IKs, IKr and trafficking in long QT syndrome. *Hum Mol Genet* 1999;**8**:1499-1507.
- Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, et al. The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 1994;**13**:505-506.
- Bissay V, Van Malderen SCh, Keymolen K, Lissens W, Peeters U, Daneels D, Jansen AC, Pappaert G, Brugada P, De Keyser J, Van Dooren S. SCN4A variants and Brugada syndrome: phenotypic and genotypic overlap between cardiac and skeletal muscle sodium channelopathies. *Eur J Hum Genet* 2016;**24**:400-407.
- Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 2005;**115**:3306-3317.
- Bowditch H. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskel fagnen des Herzens ziegen. *Arb Physiol Anstalt* 1871;**6**:139-176.
- Boyett MR. A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in the sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1981;**319**:1-22.
- Boczek NJ, Best JM, Tester DJ, Giudicessi JR, Middha S, Evans JM, Kamp TJ, Ackerman MJ. Exome sequencing and systems biology converge to identify novel mutations in the L-type calcium channel, CACNA1C, linked to autosomal dominant long QT syndrome. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;**6**:279-289.
- Bohnen MS, Peng G, Robey SH, Terrenoire C, Iyer V, Sampson KJ, Kass RS. Molecular Pathophysiology of Congenital Long QT Syndrome. *Physiol Rev* 2017;**97**:89-134.
- Boogerd CJ, Zhu X, Aneas I, Sakabe N, Zhang L, Sobreira DR, Montefiori L, Bogomolovas J, Joslin AC, Zhou B, Chen J, Nobrega MA, Evans SM. Tbx20 Is

Required in Mid-Gestation Cardiomyocytes and Plays a Central Role in Atrial Development. *Circulation research* 2018;**123**:428-442.

Boutjdir M, Lazzerini PE, Capecechi PL, Laghi-Pasini F, El-Sherif N. Potassium Channel Block and Novel Autoimmune-Associated Long QT Syndrome. *Card Electrophysiol Clin* 2016;**8**:373-384.

Brahmajothi MV, Morales MJ, Rasmusson RL, Campbell DL, Strauss HC. Heterogeneity in K⁺ channel transcript expression detected in isolated ferret cardiac myocytes. *Pacing Clin Electrophysiol* 1997;**20**:388-396.

Brehm P, Eckert R. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 1978;**202**:1203-1206.

Breitwieser GE, Szabo G. Mechanism of muscarinic receptor-induced K⁺ channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J Gen Physiol* 1988;**91**:469-493.

Brelidze TI, Carlson AE, Sankaran B, Zagotta WN. Structure of the carboxy-terminal region of a KCNH channel. *Nature* 2012;**481**:530-533.

Brelidze TI, Gianulis EC, DiMaio F, Trudeau MC, Zagotta WN. Structure of the C-terminal region of an ERG channel and functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:11648-11653.

Brendel J, Peukert S. Blockers of the Kv1.5 channels for treatment of atrial arrhythmias. *Exp Opin Ther Pat* 2002;**12**:1589-1598.

Brown AM, Lee KS, Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol* 1981;**318**:479-500.

Brown DD, Martz SN, Binder O, Goetz SC, Price BM, Smith JC, Conlon FL. Tbx5 and Tbx20 act synergistically to control vertebrate heart morphogenesis. *Development* 2005;**132**:553-563.

Buraei Z, Yang J. The β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiol Rev*. 2010;**90**:1461-1506.

Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpón E, Hu D, Desai M, Borggrefe M, Häissaguerre M, Kanter R, Pollevick GD, Guerchicoff A, Laiño R, Marieb M, Nademanee K, Nam GB, Robles R, Schimpf R, Stapleton DD, Viskin S, Winters S, Wolpert C, Zimmermann S, Veltmann C, Antzelevitch C. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2010;**7**:1872-1882.

Busch AE, Eigenberger B, Jurkiewicz NK, Salata JJ, Pica A, Suessbrich H, Lang F. Blockade of HERG channels by the class III antiarrhythmic azimilide: mode of action. *Br J Pharmacol* 1998;**123**:23-30.

Caballero R, Moreno I, González T, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 2002;**56**:104-117.

Caballero R, Moreno I, González T, Arias C, Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 2003;**107**:889-95.

Caballero R, Gómez R, Moreno I, Nuñez L, González T, Arias C, Guizy M, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Interaction of angiotensin II with the angiotensin type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current. *Cardiovasc Res*. 2004;**62**:86-95.

Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M, Osuna L, Duarte J, López-Izquierdo A, Moraleda I, Gálvez E, Sánchez-Chapula JA, Tamargo J, Delpón E. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010a;**107**:15631-15636.

Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol* 2010b;**55**:2346-2354.

Cai CL, Zhou W, Yang L, Bu L, Qyang Y, Zhang X, Li X, Rosenfeld MG, Chen J, Evans S. T-box genes coordinate regional rates of proliferation and regional specification during cardiogenesis. *Development* 2005;**132**:2475-2487.

Campuzano O, Brugada R, Iglesias A. Genetics of Brugada syndrome. *Curr Opin Cardiol* 2010;**25**:210-215.

Carmeliet E, Vereecke J. Electrogenesis of the action potential. En: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*. Berne R, Sperelakis N, Geiger S. American Physiological Society 1979:269-334.

Carmeliet E. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflügers Arch* 1987;**408**:18-26.

- Carmeliet E. Voltage- and time-dependent block of the delayed K⁺ current in cardiac myocytes by dofetilide. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;**262**:809-817.
- Carmeliet E. Mechanisms and control of repolarization. *Eur Heart J* 1993;**14** (Supp H):3-13.
- Casey ES, O'Reilly MA, Conlon FL, Smith JC. The T-box transcription factor Brachyury regulates expression of eFGF through binding to a non-palindromic response element. *Development* 1998;**125**:3887-3894.
- Casini S, Verkerk AO, Remme CA. Human iPSC-Derived Cardiomyocytes for Investigation of Disease Mechanisms and Therapeutic Strategies in Inherited Arrhythmia Syndromes: Strengths and Limitations. *Cardiovasc Drugs Ther* 2017;**31**:325-344.
- Casis O, Olesen SP, Sanguinetti MC. Mechanism of action of a novel human ether-a-go-go-related gene channel activator. *Mol Pharmacol* 2006;**69**:658-665.
- Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;**26**:13-25.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005a;**57**:397-409.
- Catterall WA, Pérez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005b;**57**:411-425.
- Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol* 2012;**590**:2577-89.
- Catterall WA. Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Exp Physiol* 2014;**99**:35-51.
- Cevenini L, Calabretta MM, Calabria D, Roda A, Michelini E. Luciferase Genes as Reporter Reactions: How to Use Them in Molecular Biology? *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2016;**154**:3-17.
- Chang PC, Chen PS. SK channels and ventricular arrhythmias in heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2015;**25**:508-514.
- Chatrath R, Bell CM, Ackerman MJ. Beta-blocker therapy failures in symptomatic probands with genotyped long-QT syndrome. *Pediatr Cardiol* 2004;**25**:459-465.
- Chen H, Kim LA, Rajan S, Xu S, Goldstein SA. Charybdotoxin binding in the IKs pore demonstrates two minK subunits in each channel complex. *Neuron* 2003;**40**:15-23.
- Chen L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackerman MJ, Kass RS. Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:20990-20995.
- Chen J, Chen K, Sroubek J, Wu ZY, Thomas D, Bian JS, McDonald TV. Post-transcriptional control of human ether-a-go-go-related gene potassium channel protein by alpha-adrenergic receptor stimulation. *Mol Pharmacol* 2010;**78**:186-197.
- Cheng J, Kamiya K, Liu W, Tsuji Y, Toyama J, Kodama I. Heterogeneous distribution of the two components of delayed rectifier K⁺ current: a potential mechanism of the proarrhythmic effects of methanesulfonanilide class III agents. *Cardiovasc Res* 1999;**43**:135-147.
- Cheng J, Van Norstrand DW, Medeiros-Domingo A, Valdivia C, Tan BH, Ye B, Kroboth S, Vatta M, Tester DJ, January CT, Makielski JC, Ackerman MJ. Alpha1-syntrophin mutations identified in sudden infant death syndrome cause an increase in late cardiac sodium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009;**2**:667-676.
- Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L, Noci I, Borri P, Borrani E, Giachi M, Becchetti A, Rosati B, Wanke E, Olivetto M, Arcangeli A. HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer* 2000;**83**:1722-1729.
- Chiamvimonvat N, Chen-Izu Y, Clancy CE, Deschenes I, Dobrev D, Heijman J, Izu L, Qu Z, Ripplinger CM, Vandenberg JJ, Weiss JN, Koren G, Banyasz T, Grandi E, Sanguinetti MC, Bers DM, Nerbonne JM. Potassium currents in the heart: Functional roles in repolarization, arrhythmia and therapeutics. *J Physiol* 2016. doi:10.1113/JP272883.
- Cho MS, Nam GB, Kim YG, Hwang KW, Kim YR, Choi H, Kim SH, Rhee KS, Kim NJ, Kim JS, Kim J, Choi KJ, Kim YH. Electrocardiographic predictors of bradycardia-induced torsades de pointes in patients with acquired atrioventricular block. *Heart Rhythm* 2015;**12**:498-505.
- Chockalingam P, Crotti L, Girardengo G, Johnson JN, Harris KM, van der Heijden JF, Hauer RN, Beckmann BM, Spazzolini C, Rordorf R, Rydberg A, Clur SA, Fischer M, van den Heuvel F, Kaab S, Blom NA, Ackerman MJ, Schwartz PJ, Wilde AA. Not all beta-blockers are equal in the management of long QT syndrome types 1 and 2: higher recurrence of events

under metoprolol. *J Am Coll Cardiol* 2012;**60**:2092-2099.

Choe S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 2002;**3**:115-121.

Choi KL, Aldrich RW, Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:5092-5095.

Choi KL, Mossman C, Aube J, Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of *Shaker* potassium channels. *Neuron* 1993;**10**:533-541.

Chopra N, Yang T, Asghari P, Moore ED, Huke S, Akin B, Cattolica RA, Perez CF, Hlaing T, Knollmann-Ritschel BE. Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca²⁺ release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;**106**:7636-7641.

Chorin E, Hu D, Antzelevitch C, Hochstadt A, Belardinelli L, Zeltser D, Barajas-Martinez H, Rozovski U, Rosso R, Adler A, Benhorin J, Viskin S. Ranolazine for Congenital Long-QT Syndrome Type III: Experimental and Long-Term Clinical Data. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2016;**9**.

Chorin E, Taub R, Medina A, Flint N, Viskin S, Benhorin J. Long-term flecainide therapy in type 3 long QT syndrome. *Europace* 2018;**20**:370-376.

Choy AM, Lang CC, Chomsky DM, Rayos GH, Wilson JR, Roden DM. Normalization of acquired QT prolongation in humans by intravenous potassium. *Circulation* 1997;**96**:2149-2154.

Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 1990;**4**:405-411.

Chua SK, Chang PC, Maruyama M, Turker I, Shinohara T, Shen MJ, Chen Z, Shen C, Rubart-von der Lohe M, Lopshire JC, Ogawa M, Weiss JN, Lin SF, Ai T, Chen PS. Small-conductance calcium-activated potassium channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles. *Circ Res* 2011;**108**:971-979.

Clarkson CW, Matsubara T, Hondeghem LM. Slow inactivation of V_{max} in guinea-pig ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1984;**247**:H645-H654.

Clatot J, Ziyadeh-Isleem A, Maugenre S, Denjoy I, Liu H, Dilanian G, Hatem SN, Deschenes I, Coulombe A, Guicheney P, Neyroud N. Dominant-negative effect of SCN5A N-terminal mutations through the interaction

of Na(v)1.5 alpha-subunits. *Cardiovasc Res* 2012;**96**:53-63.

Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:2979-2984.

Clur S-AB, Chockalingam P, Filippini LH, Widyanti AP, Van Cruysen M, Blom NA, Alders M, Hofman N, Wilde AAM. The role of the epinephrine test in the diagnosis and management of children suspected of having congenital long QT syndrome. *Pediatric cardiology* 2010;**31**:462-468.

Cockerill SL, Tobin AB, Torrecilla I, Willars GB, Standen NB, Mitcheson JS. Modulation of hERG potassium currents in HEK-293 cells by protein kinase C. Evidence for direct phosphorylation of pore forming subunits. *J Physiol* 2007;**581**:479-493.

Codding SJ, Trudeau MC. The hERG potassium channel intrinsic ligand regulates N- and C-terminal interactions and channel closure. *J Gen Physiol* 2019;**151**:478-488.

Coetzee W, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal M, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Sáenz de Miera E, Rudy B. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**868**:233-285.

Cohen SS. A guide to the polyamines. *Oxford University Press* 1998.

Compton SJ, Lux RL, Ramsey MR, Strellich KR, Sanguinetti MC, Green LS, Keating MT, Mason JW. Genetically defined therapy of inherited long-QT syndrome. Correction of abnormal repolarization by potassium. *Circulation* 1996;**94**:1018-1022.

Conti LR, Radeke CM, Shyng SL, Vandenberg CA. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 2001;**276**:41270-41278.

Coraboeuf E, Otsuka M. L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de mammifères. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956;**234**:441-444.

Coraboeuf E, Carmeliet E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982;**392**:352-359.

Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass RS. Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical

structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002;**277**:9233-9241.

Coronel R, Casini S, Koopmann TT, Wilms-Schopman FJ, Verkerk AO, de Groot JR, Bhuiyan Z, Bezzina CR, Veldkamp MW, Linnenbank AC, van der Wal AC, Tan HL, Brugada P, Wilde AA, de Bakker JM. Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study. *Circulation* 2005;**112**:2769-2777.

Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. *Shaker*, *Shal*, *Shab*, and *Shaw* express independent K⁺ current systems. *Neuron* 1991;**7**:763-773.

Cranefield P, Aronson R. Cardiac Arrhythmias: The role of trigger activity and other mechanisms. *Futura* 1975.

Crotti L, Johnson CN, Graf E, De Ferrari GM, Cuneo BF, Ovadia M, Papagiannis J, Feldkamp MD, Rath SG, Kunic JD, Pedrazzini M, Wieland T, Lichtner P, Beckmann BM, Clark T, Shaffer C, Benson DW, Kaab S, Meitinger T, Strom TM, Chazin WJ, Schwartz PJ, George AL, Jr. Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants. *Circulation* 2013;**127**:1009-1017.

Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV. Cyclic AMP regulates the HERG K(+) channel by dual pathways. *Curr Biol* 2000;**10**:671-674.

Cui J, Kagan A, Qin D, Mathew J, Melman YF, McDonald TV. Analysis of the cyclic nucleotide binding domain of the HERG potassium channel and interactions with KCNE2. *J Biol Chem* 2001;**276**:17244-17251.

Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995;**80**:795-803.

Dai G, Zagotta WN. Molecular mechanism of voltage-dependent potentiation of KCNH potassium channels. *Elife* 2017;**6**.pii: e26355.

D'Ambrosio R, Maris DO, Grady MS, Winn HR, Janigro D. Impaired K(+) homeostasis and altered electrophysiological properties of post-traumatic hippocampal glia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1999;**19**:8152-8162.

Dascal N, Schreibmayer W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, Dimagno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, Lester HA, Davidson N. Atrial G protein-activated K⁺ channel: Expression

cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:10235-10239.

De la Peña P, Alonso-Ron C, Machín A, Fernández-Trillo J, Carretero L, Domínguez P, Barros F. Demonstration of physical proximity between the N terminus and the S4-S5 linker of the human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel. *J Biol Chem* 2011;**286**:19065-19075.

De Waard M, Pragnell M, Campbell KP. Ca²⁺ channel regulation by a conserved β subunit domain. *Neuron* 1994;**13**:495-503.

Debenedittis P, Harmelink C, Chen Y, Wang Q, Jiao K. Characterization of the novel interaction between muskellin and TBX20, a critical cardiogenic transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;**409**:338-343.

Del Camino D, Holmgren M, Liu Y, Yellen G. Blocker protection in the pore of a voltage-gated K⁺ channel and its structural implications. *Nature* 2000;**403**:321-325.

Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier K⁺ current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res* 1995;**76**:223-235.

Delpón E, Caballero R, Valenzuela C, Longobardo M, Snyders D, Tamargo J. Benzocaine enhances and inhibits the K⁺ current through a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 1999;**42**:510-520.

Delpón E, Tamargo J. Electrofisiología cardíaca. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres JAF. McGraw-Hill 2005:450-562.

Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Lasrsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada Syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:209-218.

Deschênes I, Tomaselli GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett* 2002;**528**:183-188.

Devaraneni PK, Komarov AG, Costantino CA, Devereaux JJ, Matulef K, Valiyaveetil FI. Semisynthetic K⁺ channels show that the constricted conformation of the selectivity filter is not the C-type inactivated state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:15698-15703.

- Dhamoon AS, Pandit SV, Sarmast F, Parisian KR, Guha P, Li Y, Bagwe S, Taffet SM, Anumonwo JM. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K⁺ current. *Circ Res* 2004;**94**:1332-1339.
- Dhamoon AS, Jalife J. The inward rectifier current (I_{K1}) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2005;**2**:316-324.
- Dilks D, Ling HP, Cockett M, Sokol P, Numann R. Cloning and expression of the human Kv4.3 potassium channel. *J Neurophysiol* 1999;**81**:1974-1977.
- Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H, Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. The role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 1996;**79**:659-668.
- Dixon RE, Cheng EP, Mercado JL, Santana LF. L-type Ca²⁺ channel function during Timothy syndrome. *Trends Cardiovasc Med* 2012;**22**:72-76.
- Djurovic S, Iversen N, Jeansson S, Hoover F, Christensen G. Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes. *Mol Biotechnol* 2004;**28**:21-32.
- Dolz-gaitón P, Núñez M, Núñez L, Barana A, Amorós I, Matamoros M, Pérez-Hernández M, González de la Fuente M, Alvarez-López M, Macías-Ruiz R, Tercedor-Sánchez L, Jiménez-Jáimez J, Delpón E, Caballero R, Tamargo J. Functional characterization of a novel frameshift mutation in the C-terminus of the Nav1.5 channel underlying a Brugada syndrome with variable expression in a Spanish family. *PLoS One* 2013;**8**:e81493.
- Doyle DA, Morais-Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998;**280**:69-77.
- Duggal P, Vesely MR, Wattanasirichaigoon D, Villafane J, Kaushik V, Beggs AH. Mutation of the gene for IsK associated with both Jervell and Lange-Nielsen and Romano-Ward forms of Long-QT syndrome. *Circulation* 1998;**97**:142-146.
- Dumaine R, Wang Q, Keating MT, Hartmann HA, Schwartz PJ, Brown AM, Kirsch GE. Multiple mechanisms of Na⁺ channel--linked long-QT syndrome. *Circ Res* 1996;**78**:916-924.
- Dun W, Jiang M, Tseng GN. Allosteric effects of mutations in the extracellular S5-P loop on the gating and ion permeation properties of the hERG potassium channel. *Pflugers Arch* 1999;**439**:141-149.
- Dupliakov DV, Glukhova VL, Maksimova SV, Vozhdaeva ZI, Starostina IV, Vasil'eva EN, Sysuenkova EV, Svetlakova LP, Goleva SV, Sorokina TT. Frequency of detection the of Brugada syndrome signs in the course of ECG registration. *Kardiologiia* 2007;**47**:55-59.
- El-Sherif N, Turitto G. The long QT syndrome and torsade de pointes. *Pacing Clin Electrophysiol* 1999;**22**:91-110.
- El-Sherif N, Boutjdir M. Role of pharmacotherapy in cardiac ion channelopathies. *Pharmacol Ther* 2015;**155**:132-142.
- El-Sherif N, Turitto G, Boutjdir M. Acquired long QT syndrome and torsade de pointes. *Pacing Clin Electrophysiol* 2018;**41**:414-421.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;**411**:494-498.
- Ellinor PT, Lunetta KL, Glazer NL, Pfeufer A, Alonso A, Chung MK, Sinner MF, de Bakker PI, Mueller M, Lubitz SA, Fox E, Darbar D, Smith NL, Smith JD, Schnabel RB, Soliman EZ, Rice KM, Van Wagener DR, Beckmann BM, van Noord C, Wang K, Ehret GB, Rotter JI, Hazen SL, Steinbeck G, Smith AV, Launer LJ, Harris TB, Makino S, Nelis M, Milan DJ, Perz S, Esko T, Köttgen A, Moebus S, Newton-Cheh C, Li M, Möhlenkamp S, Wang TJ, Kao WH, Vasan RS, Nöthen MM, MacRae CA, Stricker BH, Hofman A, Uitterlinden AG, Levy D, Boerwinkle E, Metspalu A, Topol EJ, Chakravarti A, Gudnason V, Psaty BM, Roden DM, Meitinger T, Wichmann HE, Witteman JC, Barnard J, Arking DE, Benjamin EJ, Heckbert SR, Kääb S. Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. *Nat Genet* 2010;**42**:240-244.
- Emmi A, Wenzel HJ, Schwartzkroin PA, Taglialatela M, Castaldo P, Bianchi L, Nerbonne J, Robertson GA, Janigro D. Do glia have heart? Expression and functional role for ether-a-go-go currents in hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 2000;**20**:3915-3925.
- Epstein AE, DiMarco JP, Ellenbogen KA, Estes NA, 3rd, Freedman RA, Gettes LS, Gillinov AM, Gregoratos G, Hammill SC, Hayes DL, Hlatky MA, Newby LK, Page RL, Schoenfeld MH, Silka MJ, Stevenson LW, Sweeney MO, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Faxon DP, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura RA, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Tarkington LG, Yancy CW. ACC/AHA/HRS 2008 Guidelines for Device-Based Therapy of Cardiac

Rhythm Abnormalities: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the ACC/AHA/NASPE 2002 Guideline Update for Implantation of Cardiac Pacemakers and Antiarrhythmia Devices) developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 2008;**51**:e1-62.

Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000;**25**:533-535.

Etheridge SP, Compton SJ, Tristani-Firouzi M, Mason JW. A new oral therapy for long QT syndrome: long-term oral potassium improves repolarization in patients with HERG mutations. *J Am Coll Cardiol* 2003;**42**:1777-1782.

Fakler B, Braendle U, Bond C, Glowatzki E, König C, Adelman JP, Zenner HP, Ruppersberg JP. A structural determinant of differential sensitivity of cloned inward rectifier K⁺ channels to intracellular spermine. *FEBS Lett* 1994;**356**:199-203.

Fakler B, Braendle U, Glowatzki E, Weidemann S, Zenner HP, Ruppersberg JP. Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K⁺ channels is caused by intracellular spermine. *Cell* 1995;**80**:149-154.

Fan JS, Jiang M, Dun W, McDonald TV, Tseng GN. Effects of outer mouth mutations on hERG channel function: a comparison with similar mutations in the Shaker channel. *Biophys J* 1999;**76**:3128-3140.

Fazio G, Vernuccio F, Lo Re G, Grutta G, Mongioli M. Role of bisoprolol in patients with long QT syndrome. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2013;**18**:467-470.

Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ Res* 1993;**73**:210-216.

Feng J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: Properties and consequences. *Am J Physiol* 1998a;**275**:H1717-H1725.

Feng J, Yue L, Wang Z, Nattel S. Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circ Res* 1998b;**83**:541-551.

Fermini B, Wang Z, Duan D, Nattel S. Difference in rate dependence of transient outward current in rabbit

and human atrium. *Am J Physiol* 1992;**263**:H1747-H1754.

Fernandez D, Ghanta A, Kauffman GW, Sanguinetti MC. Physicochemical features of the HERG channel drug binding site. *J Biol Chem* 2004;**279**:10120-10127.

Fernández-Trillo J, Barros F, Machín A, Carretero L, Domínguez P, de la Peña P. Molecular determinants of interactions between the N-terminal domain and the transmembrane core that modulate hERG K⁺ channel gating. *PLoS One* 2011;**6**:e24674.

Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* 1994;**266**:1068-1072.

Ficker E, Dennis AT, Obejero-Paz CA, Castaldo P, Taglialatela M, Brown AM. Retention in the endoplasmic reticulum as a mechanism of dominant-negative current suppression in human long QT syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:2327-2337.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;**391**:806-11.

Foster MN, Coetzee WA. KATP Channels in the Cardiovascular System. *Physiol Rev*. 2016;**96**:177-252.

Fozzard HA, January CT, Makielski JC. New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle. *Circ Res* 1985;**56**:475-485.

Fozzard HA, Hanck DA, Makielski JC, Stanley BE, Sheets MF. Sodium channels in cardiac Purkinje cells. *Experientia* 1987;**43**:1162-1168.

Franqueza L, Longobardo M, Vicente J, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, Valenzuela C. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res* 1997;**81**:1053-1064.

Fridericia LS. Die Systolendauer im Elektrokardiogramm bei normalen Menschen und bei Herzkranken. *Acta Medica Scandinavica* 1920;**53**:469-486.

Fukuyama M, Wang Q, Kato K, Ohno S, Ding WG, Toyoda F, Itoh H, Kimura H, Makiyama T, Ito M, Matsuura H, Horie M. Long QT syndrome type 8: novel CACNA1C mutations causing QT prolongation and variant phenotypes. *Europace* 2014;**16**:1828-1837.

Furukawa T, Kimura S, Furukawa N, Bassett AL, Myerburg RJ. Potassium rectifier currents differ in

myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ Res* 1992;**70**:91-103.

Furutani M, Trudeau MC, Hagiwara N, Seki A, Gong Q, Zhou Z, Imamura S, Nagashima H, Kasanuki H, Takao A, Momma K, January CT, Robertson GA, Matsuoka R. Novel mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia: defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel. *Circulation* 1999;**99**:2290-2294.

Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the nondiseased human heart. *J Physiol* 2007;**582**:675-693.

Ganetzky B, Robertson GA, Wilson GF, Trudeau MC, Titus SA. The eag family of K⁺ channels in *Drosophila* and mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**868**:356-369.

Gemma LW, Ward GM, Dettmer MM, Ball JL, Leo PJ, Doria DN, Kaufman ES. beta-blockers protect against dispersion of repolarization during exercise in congenital long-QT syndrome type 1. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2011;**22**:1141-1146.

George AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 2005;**115**:1990-1999.

Gerlach AC, Stoehr SJ, Castle NA. Pharmacological removal of human ether-a-go-go-related gene potassium channel inactivation by 3-nitro-N-(4-phenoxyphenyl) benzamide (ICA-105574). *Mol Pharmacol* 2010;**77**:58-68.

Gessner G, Macianskiene R, Starkus JG, Schonherr R, Heinemann SH. The amiodarone derivative KB130015 activates hERG1 potassium channels via a novel mechanism. *Eur J Pharmacol* 2010;**632**:52-59.

Gettes LS, Reuter H. Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *J Physiol* 1974;**240**:703-724.

Ghosh TK, Brook JD, Wilsdon A. T-Box Genes in Human Development and Disease. *Curr Top Dev Biol* 2017;**122**:383-415.

Giacomini E, Buonfiglio R, Masetti M, Wang Y, Tseng GN, Roberti M, Recanatini M. A ligand-based virtual screening approach to identify small molecules as HERG channel activators. *Comb Chem High Throughput Screen* 2015;**18**:269-280.

Gianulis EC, Liu Q, Trudeau MC. Direct interaction of eag domains and cyclic nucleotide-binding homology domains regulate deactivation gating in hERG channels. *J Gen Physiol* 2013;**142**:351-66.

Giles WR, Imaizumi Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 1988;**405**:123-145.

Gintant GA, Datyner NB, Cohen IS. Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys J* 1984;**45**:509-512.

Giudicessi JR, Ackerman MJ. Genotype- and phenotype-guided management of congenital long QT syndrome. *Curr Probl Cardiol* 2013;**38**:417-455.

Goldenberg I, Mathew J, Moss AJ, McNitt S, Peterson DR, Zareba W, Benhorin J, Zhang L, Vincent GM, Andrews ML, Robinson JL, Morray B. Corrected QT variability in serial electrocardiograms in long QT syndrome: the importance of the maximum corrected QT for risk stratification. *J Am Coll Cardiol* 2006;**48**:1047-1052.

Goldenberg I, Zareba W, Moss AJ. Long QT Syndrome. *Curr Probl Cardiol* 2008;**33**:629-694.

Goldenberg I, Horr S, Moss AJ, Lopes CM, Barsheshet A, McNitt S, Zareba W, Andrews ML, Robinson JL, Locati EH, Ackerman MJ, Benhorin J, Kaufman ES, Napolitano C, Platonov PG, Priori SG, Qi M, Schwartz PJ, Shimizu W, Towbin JA, Vincent GM, Wilde AA, Zhang L. Risk for life-threatening cardiac events in patients with genotype-confirmed long-QT syndrome and normal-range corrected QT intervals. *J Am Coll Cardiol* 2011;**57**:51-59.

Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na⁺ channel. *J Exp Biol* 2002;**205**:575-584.

Goldman DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 1943;**27**:37-60.

Gómez R, Núñez L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid, block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1+minK channels. *Br J Pharmacol* 2005;**146**:146-161.

Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Amorós I, Barana A, de Prada T, Macaya C, Maroto L, Rodríguez E, Caballero R, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current (*I_{to1}*). *Cardiovasc Res* 2008;**80**:375-384.

Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA, Klein H, Vaquero M, Osuna L, Atienza F, Almendral J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide increases cardiac IK1 by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009;**105**:383-392.

Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, De Palm SH, Matamoros M, Núñez M, Pérez-Hernández M, Iriepa I, Tamargo J, Delpón E. Structural basis of drugs

that increase cardiac inward rectifier Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res* 2014;**104**:337-346.

Gómez-Lagunas F, Armstrong CM. Inactivation in *ShakerB* K⁺ channels: a test for the number of inactivating particles on each channel. *Biophys J* 1995;**68**:89-95.

Gomez-Varela D, Barros F, Vilorio CG, Giraldez T, Manso DG, Dupuy SG, Miranda P, de la Pena P. Relevance of the proximal domain in the amino-terminus of HERG channels for regulation by a phospholipase C-coupled hormone receptor. *FEBS Lett* 2003;**535**:125-130.

González T, Navarro-Polanco R, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpón E, Tamargo J, Tamkun MM, Valenzuela C. Assembly with the Kvβ1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels. *Mol Pharmacol* 2002;**62**:1456-1463.

González de la Fuente M, Barana A, Gómez R, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Sacristán S, Atienza F, Pita A, Pinto Á, Fernández-Avilés F, Caballero R, Tamargo J, Delpón E. Chronic atrial fibrillation up-regulates β1-Adrenoceptors affecting repolarizing currents and action potential duration. *Cardiovasc Res* 2013;**97**:379-388.

Grandi E, Pasqualini FS, Bers DM. A novel computational model of the human ventricular action potential and Ca transient. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:112-121.

Grandi E, Sanguinetti MC, Bartos DC, Bers DM, Chen-Izu Y, Chiamvimonvat N, Colecraft HM, Delisle BP, Heijman J, Navedo MF, Noskov S, Proenza C, Vandenberg JJ, Yarov-Yarovoy V. Potassium channels in the heart: structure, function and regulation. *J Physiol*. 2016. doi: 10.1113/JP272864.

Greulich F, Rudat C, Kispert A. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc Res* 2011;**91**:212-222.

Grunnet M, Abbruzzese J, Sachse FB, Sanguinetti MC. Molecular determinants of human ether-a-go-go-related gene 1 (hERG1) K⁺ channel activation by NS1643. *Mol Pharmacol* 2011;**79**:1-9.

Guasti L, Crociani O, Redaelli E, Pillozzi S, Polvani S, Masselli M, Mello T, Galli A, Amedei A, Wymore RS, Wanke E, Arcangeli A. Identification of a posttranslational mechanism for the regulation of hERG1 K⁺ channel expression and hERG1 current density in tumor cells. *Mol Cell Biol* 2008;**28**:5043-5060.

Guo J, Wang T, Li X, Shallow H, Yang T, Li W, Xu J, Fridman MD, Yang X, Zhang S. Cell surface

expression of human ether-a-go-go-related gene (hERG) channels is regulated by caveolin-3 protein via the ubiquitin ligase Nedd4-2. *J Biol Chem* 2012;**287**:33132-33141.

Gustina AS, Trudeau MC. A recombinant N-terminal domain fully restores deactivation gating in N-truncated and long QT syndrome mutant hERG potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:13082-13087.

Gustina AS, Trudeau MC. hERG potassium channel gating is mediated by N- and C-terminal region interactions. *J Gen Physiol* 2011;**137**:315-325.

Gustina AS, Trudeau MC. HERG potassium channel regulation by the N-terminal eag domain. *Cell Signal* 2012;**24**:1592-1598.

Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:473-508.

Guy HR, Durell SR. Structural models of Na⁺, Ca²⁺, and K⁺ channels. *Soc Gen Physiol Ser* 1995;**50**:1-16.

Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contributions of two types of calcium currents to the pacemaker potential of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1988;**359**:233-253.

Haitin Y, Carlson AE, Zagotta WN. The structural mechanism of KCNH-channel regulation by the eag domain. *Nature* 2013;**501**:444-448.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;**391**:85-100.

Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999;**286**:950-952.

Hancox JC, Levi AJ, Witchel HJ. Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K⁺ current during the cardiac ventricular action potential. *Pflügers Arch* 1998;**436**:843-853.

Hancox JC, McPate MJ, El Harchi A, Zhang YH. The hERG potassium channel and hERG screening for drug-induced torsades de pointes. *Pharmacol Ther* 2008;**119**:118-132.

- Hansen RS, Diness TG, Christ T, Demnitz J, Ravens U, Olesen SP, Grønnet M. Activation of human ether-a-go-go-related gene potassium channels by the diphenylurea 1,3-bis-(2-hydroxy-5-trifluoromethyl-phenyl)-urea (NS1643). *Mol Pharmacol* 2006;**69**:266-277.
- Harmer SC, Wilson AJ, Aldridge R, Tinker A. Mechanisms of disease pathogenesis in long QT syndrome type 5. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;**298**:C263-273.
- Hassinen M, Paajanen V, Vornanen M. A novel inwardly rectifying K⁺ channel, Kir2.5, is upregulated under chronic cold stress in fish cardiac myocytes. *J Exp Biol* 2008;**211**:2162-2171.
- Havakuk O, Viskin S. A Tale of 2 Diseases: The History of Long-QT Syndrome and Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2016;**67**:100-108.
- He A, Kong SW, Ma Q, Pu WT. Co-occupancy by multiple cardiac transcription factors identifies transcriptional enhancers active in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;**108**:5632-5637.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson R, MacKinnon R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* 1994;**66**:1061-1067.
- Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992;**356**:441-443.
- Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 1990;**343**:617-622.
- Herron TJ, Rocha AM, Campbell KF, Ponce-Balbuena D, Willis BC, Guerrero-Serna G, Liu Q, Klos M, Musa H, Zarzoso M, Bizy A, Furness J, Anumonwo J, Mironov S, Jalife J. Extracellular Matrix-Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2016;**9**:e003638.
- Herzberg IM, Trudeau MC, Robertson GA. Transfer of rapid inactivation and sensitivity to the class III antiarrhythmic drug E-4031 from HERG to M-eag channels. *J Physiol* 1998;**511**:3-14.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiological Reviews* 2010;**90**:291-366.
- Hille B. Ion channels of excitable membranes. *Sinauer* 2001.
- Hirano Y, Moscucci A, January CT. Direct measurement of L-type Ca²⁺ window current in heart cells. *Circ Res* 1992;**70**:445-455.
- Hiraoka M, Kawano S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1989;**410**:187-212.
- Hirschberg B, Rovner A, Lieberman M, Patlak J. Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels. *J Gen Physiol* 1995;**106**:1053-1068.
- Hodges M. Bazett's QT correction reviewed: evidence that a linear QT correction for heart rate is better. *J Am Coll Cardiol* 1983;**1**:694.
- Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* 1949;**108**:37-77.
- Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 1952a;**116**:473-496.
- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to induction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952b;**117**:500-544.
- Hoekstra M, Mummery CL, Wilde AA, Bezzina CR, Verkerk AO. Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias. *Front Physiol* 2012;**3**:346.
- Hoffman B, Cranefield P. *Electrophysiology of the heart*. McGraw-Hill 1960.
- Hondeghem LM. Validity of V_{max} as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophys J* 1978;**23**:147-152.
- Hondeghem LM, Katzung BG. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 1977;**472**:373-398.
- Hoorntje T, Alders M, van Tintelen P, van der Lip K, Sreeram N, van der Wal A, Mannens M, Wilde A. Homozygous premature truncation of the HERG protein : the human HERG knockout. *Circulation* 1999;**100**:1264-1267.
- Horner JM, Horner MM, Ackerman MJ. The diagnostic utility of recovery phase QTc during treadmill exercise stress testing in the evaluation of long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2011;**8**:1698-1704.
- Hosaka Y, Iwata M, Kamiya N, Yamada M, Kinoshita K, Fukunishi Y, Tsujimae K, Hibino H, Aizawa Y, Inanobe A, Nakamura H & Kurachi Y. Mutational

analysis of block and facilitation of HERG current by a class III anti-arrhythmic agent, nifekalant. *Channels (Austin)* 2007;**1**:198–208.

Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Two types of inactivation in *Shaker* K⁺ channels: effects of alterations in the carboxyterminal region. *Neuron* 1991;**7**:547–556.

Hoshi T, Armstrong CM. C-type inactivation of voltage-gated K⁺ channels: Pore constriction or dilation? *J Gen Physiol* 2013;**141**:151–160.

Hu D, Barajas-Martínez H, Pfeiffer R, Dezi F, Pfeiffer J, Buch T, Betzenhauser MJ, Belardinelli L, Kählig KM, Rajamani S, DeAntonio HJ, Myerburg RJ, Ito H, Deshmukh P, Marieb M, Nam GB, Bhatia A, Hasdemir C, Haïssaguerre M, Veltmann C, Schimpf R, Borggreffe M, Viskin S, Antzelevitch C. Mutations in SCN10A are responsible for a large fraction of cases of Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2014;**64**:66–79.

Huang R-T, Wang J, Xue S, Qiu X-B, Shi H-Y, Li R-G, Qu X-K, Yang X-X, Liu H, Li N, Li Y-J, Xu Y-J, Yang Y-Q. TBX20 loss-of-function mutation responsible for familial tetralogy of Fallot or sporadic persistent truncus arteriosus. *International journal of medical sciences* 2017;**14**:323–332.

Isacoff E, Jan Y, Jan L. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the *Shaker* K⁺ channel. *Nature* 1991;**353**:86–90.

Isom LL, Catterall WA. Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996;**383**:307–308.

Itoh H, Shimizu W, Hayashi K, Yamagata K, Sakaguchi T, Ohno S, Makiyama T, Akao M, Ai T, Noda T, Miyazaki A, Miyamoto Y, Yamagishi M, Kamakura S, Horie M. Long QT syndrome with compound mutations is associated with a more severe phenotype: a Japanese multicenter study. *Heart Rhythm* 2010;**7**:1411–1418.

James ZM, Zagotta WN. Structural insights into the mechanisms of CNBD channel function. *J Gen Physiol* 2018;**150**:225–244.

Jan LY, Barbel S, Timpe L, Laffer C, Salkoff L, O'Farrell P, Jan YN. Mutating a gene for a potassium channel by hybrid dysgenesis: an approach to the cloning of the *Shaker* locus in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983;**48**:233–245.

Janigro D, Gasparini S, D'Ambrosio R, McKhann G, 2nd, DiFrancesco D. Reduction of K⁺ uptake in glia prevents long-term depression maintenance and causes epileptiform activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1997;**17**:2813–2824.

Jervell A, Lange-Nielsen F. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* 1957;**54**:59–68.

Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology* 2005;**20**:408–416.

Jiang M, Dun W, Tseng GN. Mechanism for the effects of extracellular acidification on HERG-channel function. *Am J Physiol* 1999;**277**:H1283–H1292.

Jiang M, Cabo C, Yao J, Boyden PA, Tseng G. Delayed rectifier K⁺ currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovasc Res* 2000;**48**:34–43.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2002a;**417**:515–522.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 2002b;**417**:523–526.

Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003a;**423**:33–41.

Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003b;**423**:42–48.

Johnson JN, Ackerman MJ. Competitive sports participation in athletes with congenital long QT syndrome. *Jama* 2012;**308**:764–765.

Johnson JN, Hofman N, Haglund CM, Cascino GD, Wilde AA, Ackerman MJ. Identification of a possible pathogenic link between congenital long QT syndrome and epilepsy. *Neurology* 2009;**72**:224–231.

Johnson WH, Jr., Yang P, Yang T, Lau YR, Mostella BA, Wolff DJ, Roden DM, Benson DW. Clinical, genetic, and biophysical characterization of a homozygous HERG mutation causing severe neonatal long QT syndrome. *Pediatr Res* 2003;**53**:744–748.

Jones E, Roti Roti EC, Wang J, Delfosse SA, Robertson GA. Cardiac IKr channels minimally comprise hERG 1a and 1b subunits. *J Biol Chem* 2004;**279**:44690–44694.

Jonsson MK, van der Heyden MA, van Veen TA. Deciphering hERG channels: molecular basis of the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *J Mol Cell Cardiol* 2012;**53**:369–374.

- Josephson IR, Sánchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 1984;**54**:157-162.
- Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biol* 2003;**4**:206.
- Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Ratedependent prolongation of cardiac action potentials by a metanitosulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res* 1993;**72**:75-83.
- Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J, Tjian R. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* 1988;**242**:1566-1570.
- Kagan A, Yu Z, Fishman GI, McDonald TV. The dominant negative LQT2 mutation A561V reduces wild-type HERG expression. *J Biol Chem* 2000;**275**:11241-11248.
- Kagan A, Melman YF, Krumerman A, McDonald TV. 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K⁺ channel activity. *Embo j* 2002;**21**:1889-1898.
- Kaltenbrun E, Greco TM, Slagle CE, Kennedy LM, Li T, Cristea IM, Conlon FL. A Gro/TLE-NuRD corepressor complex facilitates Tbx20-dependent transcriptional repression. *J Proteome Res* 2013;**12**:5395-5409.
- Kallergis EM, Goudis CA, Simantirakis EN, Kochiadakis GE, Vardas PE. Mechanisms, risk factors, and management of acquired long QT syndrome: a comprehensive review. *ScientificWorldJournal* 2012;**2012**:212178.
- Kamiya K, Mitcheson JS, Yasui K, Kodama I, Sanguinetti MC. Open channel block of HERG K(+) channels by vesnarinone. *Mol Pharmacol* 2001;**60**:244-253.
- Kang J, Chen XL, Wang H, Ji J, Cheng H, Incardona J, Reynolds W, Viviani F, Tabart M, Rampe D. Discovery of a small molecule activator of the human ether-a-go-go-related gene (HERG) cardiac K⁺ channel. *Mol Pharmacol* 2005;**67**:827-836.
- Kannankeril PJ, Roden DM, Norris KJ, Whalen SP, George AL, Jr., Murray KT. Genetic susceptibility to acquired long QT syndrome: pharmacologic challenge in first-degree relatives. *Heart Rhythm* 2005;**2**:134-140.
- Kanters JK, Skibsbjerg L, Hedley PL, Dembic M, Liang B, Hagen CM, Eschen O, Grunnet M, Christiansen M, Jespersen T. Combined gating and trafficking defect in Kv11.1 manifests as a malignant long QT syndrome phenotype in a large Danish p.F29L founder family. *Scand J Clin Lab Invest* 2015;**75**:699-709.
- Kapa S, Tester DJ, Salisbury BA, Harris-Kerr C, Pungliya MS, Alders M, Wilde AA, Ackerman MJ. Genetic testing for long-QT syndrome: distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 2009;**120**:1752-1760.
- Kapplinger JD, Tester DJ, Salisbury BA, Carr JL, Harris-Kerr C, Pollevick GD, Wilde AA, Ackerman MJ. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION long QT syndrome genetic test. *Heart Rhythm* 2009;**6**:1297-1303.
- Kapoor JR. Inherited long QT syndromes: be mindful of the potassium level. *J Am Coll Cardiol* 2008;**52**:1605-1606.
- Karakikes I, Ameen M, Termglinchan V, Wu JC. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ Res* 2015;**117**:80-88.
- Kass RS, Sanguinetti MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol* 1984;**84**:705-726.
- Kelle AM, Bos JM, Etheridge SP, Cannon BC, Bryant RM, Johnson JN, Ackerman MJ. Cardiac transplantation in children and adolescents with long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2017;**14**:1182-1188.
- Kennedy ME, Nemec J, Clapham DE. Localization and interaction of epitope-tagged GIRK1 and CIR inward rectifier K⁺ channel subunits. *Neuropharmacol* 1996;**35**:831-839.
- Kennedy L, Kaltenbrun E, Greco TM. Formation of a TBX20-CASZ1 protein complex is protective against dilated cardiomyopathy and critical for cardiac homeostasis. *PLoS Genet* 2017;**13**:e1007011.
- Kenyon JL, Gibbons WR. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979;**73**:139-157.
- Khan IA. Clinical and therapeutic aspects of congenital and acquired long QT syndrome. *Am J Med* 2002;**112**:58-66.
- Khositseth A, Tester DJ, Will ML, Bell CM, Ackerman MJ. Identification of a common genetic substrate underlying postpartum cardiac events in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2004;**1**:60-64.
- Kiehn J, Lacerda AE, Wible B, Brown AM. Molecular physiology and pharmacology of HERG. Single-channel currents and block by dofetilide. *Circulation* 1996;**94**:2572-2579.

- Kiehn J. Regulation of the cardiac repolarizing HERG potassium channel by protein kinase A. *Trends Cardiovasc Med* 2000;**10**:205-209.
- Kim J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Neuron* 2004;**41**:745-754.
- Kin Y, Misumi Y, Ikehara Y. Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl peptidase IV-related protein. *J Biochem* 2001;**129**:289-295.
- Kirk EP, Sunde M, Costa MW, Rankin SA, Wolstein O, Castro ML, Butler TL, Hyun C, Guo G, Otway R, Mackay JP, Waddell LB, Cole AD, Hayward C, Keogh A, Macdonald P, Griffiths L, Fatkin D, Sholler GF, Zorn AM, Feneley MP, Winlaw DS, Harvey RP. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2007;**81**:280-291.
- Kirshenbaum LA, MacLellan WR, Mazur W, French BA, Schneider MD. Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 1993;**92**:381-387.
- Kispert A, Herrmann BG. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *Embo j* 1993;**12**:3211-3220.
- Klockner U, Mikala G, Schwartz A, Varadi G. Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent Ca^{2+} channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem* 1996;**271**:22293-22296.
- Kobayashi YM, Jones LR. Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J Biol Chem* 1999;**274**:28660-28668.
- Koch SE, Bodi I, Schwartz A, Varadi G. Architecture of Ca^{2+} channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem* 2000;**275**:34493-34500.
- Kong W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF. Isolation and characterization of the human gene encoding I_{to} : further diversity by alternative mRNA splicing. *Am J Physiol* 1998;**275**:H1963-H1970.
- Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirovic B, Krapivinsky L, Clapham DE. The G-protein gated atrial K_1 channel I_{KACH} is a heteromultimer of two inwardly rectifying K^+ channel protein. *Nature* 1995;**374**:135-141.
- Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *tbx20*. *Mech Dev* 2001;**100**:87-91.
- Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S. Crystal structure of the tetramerization domain of the *Shaker* potassium channel. *Nature* 1998;**392**:945-948.
- Krishnan Y, Li Y, Zheng R, Kanda V, McDonald TV. Mechanisms underlying the protein-kinase mediated regulation of the HERG potassium channel synthesis. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1823**:1273-1284.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:509-526.
- Kukla P, Biernacka EK, Baranchuk A, Jastrzebski M, Jagodzinska M. Electrocardiogram in Andersen-Tawil syndrome. New electrocardiographic criteria for diagnosis of type-1 Andersen-Tawil syndrome. *Curr Cardiol Rev* 2014;**10**:222-228.
- Kukuljan M, Labarca P, Latorre R. Molecular determinants of ion conduction and inactivation in K^+ channels. *Am J Physiol* 1995;**268**:C535-C556.
- Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001;**107**:801-813.
- Kupershmidt S, Snyders DJ, Raes A, Roden DM. A K^+ channel splice variant common in human heart lacks a C-terminal domain required for expression of rapidly activating delayed rectifier current. *J Biol Chem* 1998;**273**:27231-27235.
- Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T. Short-term desensitization of muscarinic K^+ channel current in isolated atrial myocytes and possible role of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 1987; **410**:227-233.
- Kurata HT, Fedida D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;**92**:185-208.
- Kwak YG, Hu N, Wei J, George AL Jr, Grobaski TD, Tamkun MM, Murray KT. Protein kinase A phosphorylation alters $\text{Kv}\beta 1.3$ subunit-mediated inactivation of the $\text{Kv}1.5$ potassium channel. *J Biol Chem* 1999;**274**:13928-13932.
- Kurokawa J, Abriel H, Kass RS. Molecular basis of the delayed rectifier current I_{Ks} in heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:873-882.

- Lacinová L. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 2005;**1**:1-78.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**:680-685.
- Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circ Res* 2017;**120**:1969-1993.
- Lang SE, Westfall MV. Gene transfer into cardiac myocytes. *Methods Mol Bio.* 2015;**1299**:177-190.
- Lazzerini PE, Capecchi PL, Laghi-Pasini F. Long QT Syndrome: An Emerging Role for Inflammation and Immunity. *Front Cardiovasc Med* 2015;**2**:26.
- Lazzerini PE, Yue Y, Srivastava U, Fabris F, Capecchi PL, Bertolozzi I, Bacarelli MR, Morozzi G, Acampa M, Natale M, El-Sherif N, Galeazzi M, Laghi-Pasini F, Boutjdir M. Arrhythmogenicity of Anti-Ro/SSA Antibodies in Patients With Torsades de Pointes. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2016;**9**:e003419.
- Lee KS, Marbán E, Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 1985;**364**:395-411.
- Lee TE, Philipson LH, Nelson DJ. N-type inactivation in the mammalian *Shaker* K⁺ channel Kv1.4. *J Membrane Biol* 1996;**151**:225-235.
- Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KvLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 1997;**15**:181-185.
- Lees-Miller JP, Kondo C, Wang L, Duff HJ. Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K⁺ channel in mouse and human hearts. *Circ Res* 1997;**81**:719-726.
- Lees-Miller JP, Duan Y, Teng GQ, Duff HJ. Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in *Xenopus* oocytes: involvement of S6 sites. *Mol Pharmacol* 2000;**57**:367-374.
- Lees-Miller JP, Duan Y, Teng GQ, Duff HJ. Molecular determinant of high-affinity dofetilide binding to HERG1 expressed in *Xenopus* oocytes: involvement of S6 sites. *Mol Pharmacol* 2000;**57**:367-374.
- Lehnart SE, Ackerman MJ, Benson DW Jr, Brugada R, Clancy CE, Donahue JK, George AL Jr, Grant AO, Groft SC, January CT, Lathrop DA, Lederer WJ, Makielski JC, Mohler PJ, Moss A, Nerbonne JM, Olson TM, Przywara DA, Towbin JA, Wang LH, Marks AR. Inherited arrhythmias. A National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases Workshop. Consensus report about the diagnosis, phenotyping, molecular mechanisms, and therapeutic approaches for primary cardiomyopathies of gene mutations affecting ion channel function. *Circulation* 2007;**116**:2325-2345.
- Lei EP, Silver PA. Protein and RNA export from the nucleus. *Dev Cell* 2002;**2**:261-272.
- Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996a;**78**:903-915.
- Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996b;**78**:689-696.
- Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, Brook JD. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 1997;**15**:21-29.
- Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M. Transmural heterogeneity of action potentials and *I*_{to1} in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am J Physiol* 1998;**275**:H369-H377.
- Li Q, Gayen S, Chen AS, Huang Q, Raida M, Kang C. NMR solution structure of the N-terminal domain of hERG and its interaction with the S4-S5 linker. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;**403**:126-132.
- Li Q, Ng HQ, Yoon HS, Kang C. Solution structure of the cyclic-nucleotide binding homology domain of a KCNH channel. *J Struct Biol* 2014;**186**:68-74.
- Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, Walls JR, McAuliffe F, Adamson SL, Henkelman RM, Wrana JL, Rossant J, Bruneau BG. Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* 2004;**432**:107-112.
- Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel. *Nature* 1991;**353**:752-756.
- Lin MT, Wu MH, Chang CC, Chiu SN, Thériault O, Huang H, Christé G, Ficker E, Chahine M. In utero onset of long QT syndrome with atrioventricular block and spontaneous or lidocaine-induced ventricular tachycardia: compound effects of hERG pore region mutation and SCN5A N-terminus variant. *Heart Rhythm* 2008;**5**:1567-1574.

- Litovsky SH, Antzelevitch C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 1988;**62**:116-126.
- Liu GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seeböhm G, Brüggemann A, Kummer W, Veh RW, Daut J, Preisig-Müller R. Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K⁺ channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 2001;**532**:115-126.
- Liu J, Zhang M, Jiang M, Tseng GN. Structural and functional role of the extracellular s5-p linker in the HERG potassium channel. *J Gen Physiol* 2002;**120**:723-737.
- Liu C, Shen A, Li X, Jiao W, Zhang X, Li Z. T-box transcription factor TBX20 mutations in Chinese patients with congenital heart disease. *Eur J Med Genet* 2008;**51**:580-587.
- Liu X, Wang Y, Zhang H, Shen L, Xu Y. Different protein kinase C isoenzymes mediate inhibition of cardiac rapidly activating delayed rectifier K(+) current by different G-protein coupled receptors. 2017;**174**:4464-4477.
- Lomax AE, Kondo CS, Giles WR. Comparison of time- and voltage-dependent K⁺ currents in myocytes from left and right atria of adult mice. *Am J Physiol* 2003;**285**:H1837-H1848.
- London B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Satler CA, Roberson GA. Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K⁺ current. *Circ Res* 1997;**81**:870-878.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 2005a;**309**:897-903.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 2005b;**309**:903-908.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 1994;**372**:366-369.
- Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I_{K1}. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:625-638.
- López-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of *Shaker* potassium channels. *Recept Channels* 1993;**1**:61-71.
- Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**51**:288-298.
- Lu Y, Mahaut-Smith MP, Varghese A, Huang CL, Kemp PR, Vandenberg JI. Effects of premature stimulation on HERG K(+) channels. *The Journal of physiology* 2001;**537**:843-851.
- Lu Y, Mahaut-Smith MP, Huang CL, Vandenberg JI. Mutant MiRP1 subunits modulate HERG K⁺ channel gating: a mechanism for pro-arrhythmia in long QT syndrome type 6. *J Physiol* 2003;**551**:253-262.
- Lundby A, Olesen SP. KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**346**:958-967.
- Lundquist AL, Manderfield LJ, Vanoye CG, Rogers CS, Donahue BS, Chang PA, Drinkwater DC, Murray KT, George AL Jr. Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of IKs. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:277-287.
- Luo X, Xiao J, Lin H, Lu Y, Yang B, Wang Z. Genomic structure, transcriptional control, and tissue distribution of HERG1 and KCNQ1 genes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;**294**:H1371-1380.
- Macindoe I, Glockner L, Vukasin P, Stennard FA, Costa MW, Harvey RP, Mackay JP, Sunde M. Conformational stability and DNA binding specificity of the cardiac T-box transcription factor Tbx20. *J Mol Biol* 2009;**389**:606-618.
- MacKinnon R, Yelen G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science* 1990;**250**:276-279.
- MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991;**350**:232-235.
- MacKinnon R, Aldrich RW, Lee AW. Functional stoichiometry of *Shaker* potassium channel inactivation. *Science* 1993;**262**:757-759.
- MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Lett* 2003;**555**:62-65.
- Mahati E, Li P, Kurata Y, Maharani N, Ikeda N, Sakata S, Ogura K, Miake J, Aiba T, Shimizu W, Nakasone N, Ninomiya H, Higaki K, Yamamoto K, Nakai A, Shirayoshi Y, Hisatome I. M3 Muscarinic Receptor Signaling Stabilizes a Novel Mutant Human Ether-a-Go-Go-Related Gene Channel Protein via Phosphorylation of Heat Shock Factor 1 in Transfected Cells. *Circ J* 2016;**80**:2443-2452.

- Mahida S, Hogarth AJ, Cowan C, Tayebjee MH, Graham LN, Pepper CB. Genetics of congenital and drug-induced long QT syndromes: current evidence and future research perspectives. *J Interv Card Electrophysiol* 2013;**37**:9-19.
- Mahida S, Mills RW, Tucker NR, Simonson B, Macri V, Lemoine MD, Das S, Milan DJ, Ellinor PT. Overexpression of KCNN3 results in sudden cardiac death. *Cardiovasc Res* 2014;**101**:326-334.
- Maier R, Bilbe G, Rediske J, Lotz M. Inducible nitric oxide synthase from human articular chondrocytes: cDNA cloning and analysis of mRNA expression. *Biochim Biophys Acta* 1994;**1208**:145-150.
- Main MC, Bryant SM, Hart G. Regional differences in action potential characteristics and membrane currents of guinea-pig left ventricular myocytes. *Exp Physiol* 1998;**83**:747-761.
- Maira M, Couture C, Le Martelot G, Pulichino AM, Bilodeau S, Drouin J. The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 co-activators and mediates hormone action. *J Biol Chem* 2003;**278**:46523-46532.
- Makielski JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, Kyle JW. Coexpression of $\beta 1$ with cardiac sodium channel α subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Mol Pharmacol* 1996;**49**:30-39.
- Makita N, Behr E, Shimizu W, Horie M, Sunami A, Crotti L, Schulze-Bahr E, Fukuhara S, Mochizuki N, Makiyama T, Itoh H, Christiansen M, McKeown P, Miyamoto K, Kamakura S, Tsutsui H, Schwartz PJ, George AL, Jr., Roden DM. The E1784K mutation in SCN5A is associated with mixed clinical phenotype of type 3 long QT syndrome. *J Clin Invest* 2008;**118**:2219-2229.
- Maltsev VA, Silverman N, Sabbah HN, Undrovinas AI. Chronic heart failure slows late sodium current in human and canine ventricular myocytes: implications for repolarization variability. *Eur J Heart Fail* 2007;**9**:219-27.
- Mandel EM, Kaltenbrun E, Callis TE, Zeng XX, Marques SR, Yelon D, Wang DZ, Conlon FL. The BMP pathway acts to directly regulate Tbx20 in the developing heart. *Development* 2010;**137**:1919-1929.
- Marian AJ, Yu QT, Mann DL, Graham FL, Roberts R. Expression of a mutation causing hypertrophic cardiomyopathy disrupts sarcomere assembly in adult feline cardiac myocytes. *Circ Res* 1995;**77**:98-106.
- Mark MD, Herlitz S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K^+ channels. *Eur J Biochem* 2000;**267**:5830-5836.
- Martin RL, Koumi S, Ten Eick RE. Comparison of the effects of internal $[Mg^{2+}]$ on I_{K1} in cat and guinea-pig cardiac ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1995;**27**:673-691.
- Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 2002;**295**:496-499.
- Matamoros M, Pérez-Hernández M, Guerrero-Serna G, Amorós I, Barana A, Núñez M, Ponce-Balbuena D, Sacristán S, Gómez R, Tamargo J, Caballero R, Jalife J, Delpón E. Nav1.5 N-terminal domain binding to $\alpha 1$ -syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovasc Res* 2016;**110**:279-290.
- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg^{2+} . *Nature* 1987;**325**:156-159.
- Mazzanti A, Maragna R, Faragli A, Monteforte N, Bloise R, Memmi M, Novelli V, Baiardi P, Bagnardi V, Etheridge SP, Napolitano C, Priori SG. Gene-Specific Therapy With Mexiletine Reduces Arrhythmic Events in Patients With Long QT Syndrome Type 3. *J Am Coll Cardiol* 2016;**67**:1053-1058.
- McCormack T, McCormack K, Nadal MS, Vieira E, Ozaita A, Rudy B. The effects of *Shaker* β -subunits on the human lymphocyte K^+ channel Kv1.3. *J Biol Chem* 1999;**274**:20123-20126.
- McCrossan ZA, Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004;**47**:787-821.
- McDonald TV, Yu Z, Ming Z, Palma E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SA, Fishman GI. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current $I(Kr)$. *Nature* 1997;**388**:289-292.
- McFerran BW, MacEwan DJ, Guild SB. Involvement of multiple protein kinase C isozymes in the ACTH secretory pathway of AtT-20 cells. *Br J Pharmacol* 1995;**115**:307-315.
- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna MT, Makielski JC, Ackerman MJ. SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2007;**116**:134-142.
- Meijer van Putten RM, Mengarelli I, Guan K, Zegers JG, van Ginneken AC, Verkerk AO, Wilders R. Ion channelopathies in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes: a dynamic clamp study with virtual IK1. *Front Physiol* 2015;**6**:7.
- Meins M, Henderson DJ, Bhattacharya SS, Sowden JC. Characterization of the human TBX20 gene, a new

member of the T-Box gene family closely related to the *Drosophila* H15 gene. *Genomics* 2000;**67**:317-332.

Melnyk P, Zhang L, Shrier A, Nattel S. Differential distribution of Kir2.1 and Kir2.3 subunits in canine atrium and ventricle. *Am J Physiol* 2002;**283**:H1123-H1133.

Messenger NJ, Kabitschke C, Andrews R, Grimmer D, Nunez Miguel R, Blundell TL, Smith JC, Wardle FC. Functional specificity of the *Xenopus* T-domain protein Brachyury is conferred by its ability to interact with Smad1. *Dev Cell* 2005;**8**:599-610.

Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Tang S, Schwartz A. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type Ca^{2+} channel pore. *FEBS Lett* 1993;**335**:265-269.

Mitra R, Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**:5340-5344.

Miskolczi-McCallum CM, Scavetta RJ, Svendsen PC, Soanes KH, Brook WJ. The *Drosophila melanogaster* T-box genes midline and H15 are conserved regulators of heart development. *Dev Biol* 2005;**278**:459-472.

Mitcheson JS, Sanguinetti MC. Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:201-216.

Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC. A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000a;**97**:12329-12333.

Mitcheson JS, Chen J, Sanguinetti MC. Trapping of a methanesulfonanilide by closure of the HERG potassium channel activation gate. *J Gen Physiol* 2000b;**115**:229-240.

Mitra R, Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**:5340-5344.

Mittal A, Sharma R, Prasad R, Bahl A, Khullar M. Role of cardiac TBX20 in dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 2016;**414**:129-136.

Mizukami K, Yokoshiki H, Mitsuyama H, Watanabe M, Tenma T, Takada S, Tsutsui H. Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} current is upregulated via the phosphorylation of CaMKII in cardiac hypertrophy from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;**309**:H1066-H1074.

Mizusawa Y, Horie M, Wilde AA. Genetic and clinical advances in congenital long QT syndrome. *Circ J* 2014;**78**:2827-2833.

Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haurogne K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V. Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* 2003;**421**:634-639.

Molokhia M, Pathak A, Lapeyre-Mestre M, Caturla L, Montastruc JL, McKeigue P. Case ascertainment and estimated incidence of drug-induced long-QT syndrome: study in Southwest France. *Br J Clin Pharmacol* 2008;**66**:386-395.

Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, Mackinnon R. Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* 1998;**95**:649-55.

Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K^{+} selectivity filter. *Nature* 2001;**414**:37-42.

Morais-Cabral JH, Robertson GA. The enigmatic cytoplasmic regions of KCNH channels. *J Mol Biol* 2015;**427**:67-76.

Morales MJ, Castellino RC, Crews AL, Rasmusson RL, Strauss HC. A novel β subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel α subunits. *J Biol Chem* 1995;**270**:6272-6277.

Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'hahan N, Vivaudou M. The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J* 2000;**19**:6644-6651.

Moreau C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M. SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:951-963.

Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, Jackson AP. $\beta 3$: An additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:2308-2313.

Moss AJ, Liu JE, Gottlieb S, Locati EH, Schwartz PJ, Robinson JL. Efficacy of permanent pacing in the management of high-risk patients with long QT syndrome. *Circulation* 1991;**84**:1524-1529.

Moss AJ, Zareba W, Benhorin J, Locati EH, Hall WJ, Robinson JL, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Lehmann MH. ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation* 1995;**92**:2929-2934.

Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J, Vincent GM, Locati EH, Priori SG, Napolitano C, Medina A, Zhang L, Robinson JL, Timothy K, Towbin JA, Andrews ML. Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2000;**101**:616-623.

Moss AJ, Zareba W, Kaufman ES, Gattman E, Peterson DR, Benhorin J, Towbin JA, Keating MT, Priori SG, Schwartz PJ, Vincent GM, Robinson JL, Andrews ML, Feng C, Hall WJ, Medina A, Zhang L, Wang Z. Increased risk of arrhythmic events in long-QT syndrome with mutations in the pore region of the human ether-a-go-go-related gene potassium channel. *Circulation* 2002;**105**:794-799.

Moss AJ, Windle JR, Hall WJ, Zareba W, Robinson JL, McNitt S, Severski P, Rosero S, Daubert JP, Qi M, Cieciorcka M, Manalan AS. Safety and efficacy of flecainide in subjects with Long QT-3 syndrome (DeltaKPQ mutation): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2005;**10**:59-66.

Moss AJ, Zareba W, Schwarz KQ, Rosero S, McNitt S, Robinson JL. Ranolazine shortens repolarization in patients with sustained inward sodium current due to type-3 long-QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008;**19**:1289-1293.

Muller CW, Herrmann BG. Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature* 1997;**389**:884-888.

Muñoz V, Vaidyanathan R, Tolkacheva EG, Dhamoon AS, Taffet SM, Anumonwo JM. Kir2.3 isoform confers pH sensitivity to heteromeric Kir2.1/Kir2.3 channels in HEK293 cells. *Heart Rhythm* 2007;**4**:487-496.

Muskett FW, Thouta S, Thomson SJ, Bowen A, Stansfeld PJ, Mitcheson JS. Mechanistic insight into human ether-a-go-go-related gene (hERG) K⁺ channel deactivation gating from the solution structure of the EAG domain. *J Biol Chem* 2011;**286**:6184-6191.

Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 1996;**93**:168-177.

Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* 2003;**37**:449-461.

Nademanee K, Veerakul G, Nimmannit S, Chaowakul V, Bhuripanyo K, Likittanasombat K, Tunsanga K,

Kuasirikul S, Malasit P, Tansupasawadikul S, Tatsanavivat P. Arrhythmogenic marker for the sudden unexplained death syndrome in Thai men. *Circulation* 1997;**96**:2595-2600.

Nagy N, Szuts V, Horvath Z, Seprenyi G, Farkas AS, Acsai K, Prorok J, Bitay M, Kun A, Pataricza J, Papp JG, Nanasi PP, Varro A, Toth A. Does small-conductance calcium-activated potassium channel contribute to cardiac repolarization? *J Mol Cell Cardiol* 2009;**47**:656-663.

Naiche LA, Harrelson Z, Kelly RG, Papaioannou VE. T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet* 2005;**39**:219-239.

Nakahira K, Shi G, Rhodes KJ, Trimmer JS. Selective interaction of voltage-gated K⁺ channel beta-subunits with alpha-subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:7084-7089.

Nakamura TY, Artman M, Rudy B, Coetzee WA. Inhibition of rat ventricular IK1 with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *Am J Physiol* 1998;**274**:H892-H900.

Nakano Y, Shimizu W. Genetics of long-QT syndrome. *J Hum Genet* 2016;**61**:51-55.

Napolitano C, Bloise R, Priori SG. Gene-specific therapy for inherited arrhythmogenic diseases. *Pharmacol Ther* 2006;**110**:1-13.

Napolitano C, Novelli V, Francis MD, Priori SG. Genetic modulators of the phenotype in the long QT syndrome: state of the art and clinical impact. *Curr Opin Genet Dev* 2015;**33**:17-24.

Nattel S, Singh BN. Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions. *Am J Cardiol* 1999;**84**:11R-19R.

Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002;**415**:219-226.

Nattel S, Yue L, Wang Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers. A novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:217-226.

Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;**525**:285-298.

Neher E. Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 1992;**207**:123-131.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;**85**:1205-1253.

- Nernst W. Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion. *Z Phys Chem* 1888;613-637.
- Ng CA, Hunter MJ, Perry MD, Mobli M, Ke Y, Kuchel PW, King GF, Stock D, Vandenberg JI. The N-terminal tail of hERG contains an amphipathic α -helix that regulates channel deactivation. *PLoS One* 2011;6:e16191.
- Nguyen HL, Pieper GH, Wilders R. Andersen-Tawil syndrome: clinical and molecular aspects. *Int J Cardiol* 2013;170:1-16.
- Nichols CG, Makhina EN, Pearson WL, Sha Q, Lopatin AN. Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ Res* 1996;78:1-7.
- Nichols CG, Singh GK, Grange DK. KATP channels and cardiovascular disease: suddenly a syndrome. *Circ Res* 2013;112:1059-1072.
- Nieto-Marín P, Jiménez-Jáimez J, Tinaquero D, Alfayate S, Utrilla RG, Rodríguez Vázquez Del Rey MDM, Perin F, Sarquella-Brugada G, Monserrat L, Brugada J, Tercedor L, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Digenic Heterozygosity in SCN5A and CACNA1C Explains the Variable Expressivity of the Long QT Phenotype in a Spanish Family. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2019;72:324-332.
- Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985;316:443-446.
- Nishida M, MacKinnon R. Structural basis of inward rectification. Cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 2002;111:957-965.
- Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (I_{to}) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:12-25.
- Noda M, Suzuki H, Huma S, Stühmer W. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* 1989;259:213-216.
- Ntiloudi D, Giannakoulas G, Parcharidou D, Panagiotidis T, Gatzoulis MA, Karvounis H. Adult congenital heart disease: A paradigm of epidemiological change. *Int J Cardiol* 2016;218:269-274.
- Numaguchi H, Johnson JP Jr, Petersen CI, Balser JR. A sensitive mechanism for cation modulation of potassium current. *Nat Neurosci* 2000;3:429-430.
- Ogielska EM, Zagotta WN, Hoshi T, Heinemann SH, Haab J, Aldrich RW. Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K^+ channels. *Biophys J* 1995;69:2449-2457.
- Olde Nordkamp LR, Postema PG, Knops RE, van Dijk N, Limpens J, Wilde AA, de Groot JR. Implantable cardioverter-defibrillator harm in young patients with inherited arrhythmia syndromes: A systematic review and meta-analysis of inappropriate shocks and complications. *Heart Rhythm* 2016;13:443-454.
- Oliva C, Cohen IS, Pennefather P. The mechanism of rectification of $iK1$ in canine Purkinje myocytes. *J Gen Physiol* 1990;96:299-318.
- Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:851-872.
- Panyi G, Sheng Z, Deutsch C. C-type inactivation of a voltage-gated K^+ channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J* 1995;69:896-903.
- Papaiannou VE. T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol* 2001;207:1-70.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of genomic and complementary DNA from *Shaker*, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 1987;237:749-753.
- Patlak J, Ortiz M. Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J Gen Physiol* 1985;86:89-104.
- Payandeh J, Scheuer T, Zheng N, Catterall WA. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 2011;475:353-358.
- Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, Choe S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 2005;8:279-287.
- Pelleg A, Belardinelli L. Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 1993;27:54-61.
- Pérez-Hernández M, Matamoros M, Barana A, Amorós I, Gómez R, Núñez M, Sacristán S, Pinto Á, Fernández-Avilés F, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Pitx2c increases in atrial myocytes from chronic atrial fibrillation patients enhancing IKs and decreasing ICa,L . *Cardiovasc Res* 2016;109:431-441.

Pérez-Hernández M, Matamoros M, Alfayate S, Nieto-Marín P, Utrilla RG, Tinaquero D, de Andrés R, Crespo T, Ponce-Balbuena D, Willis BC, Jiménez-Vazquez EN, Guerrero-Serna G, da Rocha AM, Campbell K, Herron TJ, Díez-Guerra FJ, Tamargo J, Jalife J, Caballero R, Delpón E. Brugada syndrome trafficking-defective Nav1.5 channels can trap cardiac Kir2.1/2.2 channels. *JCI Insight* 2018;**3**:e96291.

Pérez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-Type calcium channels. *Physiol Rev* 2003;**83**:117-161.

Perrin MJ, Subbiah RN, Vandenberg JJ, Hill AP. Human ether-a-go-go related gene (hERG) K⁺ channels: function and dysfunction. *Prog Biophys Mol Biol* 2008;**98**:137-148.

Perry M, Sachse FB, Abbruzzese J, Sanguinetti MC. PD-118057 contacts the pore helix of hERG1 channels to attenuate inactivation and enhance K⁺ conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:20075-20080.

Perry M, Sanguinetti M, Mitcheson J. Revealing the structural basis of action of hERG potassium channel activators and blockers. *J Physiol* 2010;**588**:3157-3167.

Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT. Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 1999;**22**:549-558.

Peterson BZ, Lee JS, Mulle JG, Wang Y, de Leon M, Yue DT. Critical determinants of Ca²⁺-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca²⁺ channels. *Biophys J* 2000;**78**:1906-1920.

Piper DR, Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. Voltage sensor movement in the hERG K⁺ channel. *Novartis Found Symp* 2005;**266**:46-52; discussion 52-46, 95-49.

Pinto JM, Boyden PA. Reduced inward rectifying and increased E-4031-sensitive K⁺ current density in arrhythmogenic subendocardial purkinje myocytes from the infarcted heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;**9**:299-311.

Plageman TF, Jr., Yutzey KE. T-box genes and heart development: putting the "T" in heart. *Dev Dyn* 2005;**232**:11-20.

Plant LD, Xiong D, Dai H, Goldstein SA. Individual IKs channels at the surface of mammalian cells contain two KCNE1 accessory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;**111**:E1438-E1446.

Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canun S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL, Jr., Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C,

Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptacek LJ. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 2001;**105**:511-519.

Poet M, Tauc M, Lingueglia E, Cance P, Poujeol P, Lazdunski M, Counillon L. Exploration of the pore structure of a peptide-gated Na⁺ channel. *EMBO J* 2001;**20**:5595-602.

Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I(Kr) channels. *J Biol Chem* 2000;**275**:5997-6006.

Posch MG, Gramlich M, Sunde M, Schmitt KR, Lee SH, Richter S, Kersten A, Perrot A, Panek AN, Al Khatib IH, Nemer G, Megarbane A, Dietz R, Stiller B, Berger F, Harvey RP, Ozcelik C. A gain-of-function TBX20 mutation causes congenital atrial septal defects, patent foramen ovale and cardiac valve defects. *J Med Genet* 2010;**47**:230-235.

Potet F, Chagot B, Anghelescu M, Viswanathan PC, Stepanovic SZ, Kupersmidt S, Chazin WJ, Balser JR. Functional Interactions between Distinct Sodium Channel Cytoplasmic Domains through the Action of Calmodulin. *J Biol Chem* 2009;**284**:8846-8854.

Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. Calcium channel β subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the $\alpha 1$ subunit. *Nature* 1994;**368**:67-70.

Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation* 1999;**99**:529-533.

Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R, Cappelletti D. Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2003;**348**:1866-1874.

Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ, Grillo M, Bloise R, Ronchetti E, Moncalvo C, Tulipani C, Veia A, Bottelli G, Nastoli J. Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers. *Jama* 2004;**292**:1341-1344.

Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, Blom N, Brugada J, Chiang CE, Huikuri H, Kannankeril P, Krahn A, Leenhardt A, Moss A, Schwartz PJ, Shimizu W, Tomaselli G, Tracy C. HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes: document endorsed by HRS, EHRA, and APHRS in May 2013 and by ACCF,

AHA, PACES, and AEPC in June 2013. *Heart Rhythm* 2013;**10**:1932-1963.

Priori SG, Blomstrom-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, Elliott PM, Fitzsimons D, Hatala R, Hindricks G, Kirchhof P, Kjeldsen K, Kuck KH, Hernandez-Madrid A, Nikolaou N, Norekval TM, Spaulding C, Van Veldhuisen DJ. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J* 2015;**36**:2793-2867.

Pugh BF, Tjian R. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 1990;**61**:1187-1197.

Qian L, Mohapatra B, Akasaka T, Liu J, Ocorr K, Towbin JA, Bodmer R. Transcription factor neuromancer/TBX20 is required for cardiac function in Drosophila with implications for human heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:19833-19838.

Rabkin SW, Cheng XB. Nomenclature, categorization and usage of formulae to adjust QT interval for heart rate. *World J Cardiol* 2015;**7**:315-325.

Radicke S, Cotella D, Graf EM, Banse U, Jost N, Varro A, Tseng GN, Ravens U, Wettwer E. Functional modulation of the transient outward current I_{to} by KCNE β -subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc Res* 2006;**71**:695-703.

Radicke S, Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Ravens U, Wettwer E, Delpón E. Effects of MiRP1 and DPP6 β -subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:774-786.

Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV, Strauss HC. Inactivation of voltage-gated cardiac K^+ channels. *Circ Res* 1998;**82**:739-750.

Rautaharju PM, Mason JW, Akiyama T. New age- and sex-specific criteria for QT prolongation based on rate correction formulas that minimize bias at the upper normal limits. *Int J Cardiol* 2014;**174**:535-540.

Recanatini M, Poluzzi E, Masetti M, Cavalli A, De Ponti F. QT prolongation through hERG $K(+)$ channel blockade: current knowledge and strategies for the early prediction during drug development. *Med Res Rev* 2005;**25**:133-166.

Reed GJ, Boczek NJ, Etheridge SP, Ackerman MJ. CALM3 mutation associated with long QT syndrome. *Heart rhythm* 2015;**12**:419-422.

Remme CA, Wilde AAM, Bezzina CR. Cardiac sodium channel overlap syndromes: different faces of SCN5A mutations. *Trends Cardiovasc Med* 2008;**18**:78-87.

Roden DM, George AL Jr. Structure and function of cardiac sodium and potassium channels. *Am J Physiol* 1997;**273**:H511-H525.

Roden DM. Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med* 2004;**350**:1013-1022.

Roden DM, Viswanathan PC. Genetics of acquired long QT syndrome. *J Clin Invest* 2005;**115**:2025-2032.

Romano C, Gemme G, Pongiglione R. [RARE CARDIAC ARRHYTHMIAS OF THE PEDIATRIC AGE. I. REPETITIVE PAROXYSMAL TACHYCARDIA]. *Minerva Pediatr* 1963;**15**:1155-1164.

Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel β subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001;**533**:119-125.

Rougier JS, Abriel H. Cardiac voltage-gated calcium channel macromolecular complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2016;**1863**:1806-12.

Roux B, MacKinnon R. The cavity and pore helices in the KcsA K^+ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 1999;**285**:100-102.

Roux-Buisson N, Cacheux M, Fourest-Lieuvain A, Fauconnier J, Brocard J, Denjoy I, Durand P, Guicheney P, Kyndt F, Leenhardt A, Le Marec H, Lucet V, Mabo P, Probst V, Monnier N, Ray PF, Santoni E, Trémeaux P, Lacampagne A, Fauré J, Lunardi J, Marty I. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Human molecular genetics* 2012;**21**:2759-2767.

Rudy B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J Physiol* 1978;**283**:1-21.

Ruppersberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 1990;**345**:475-476.

Ryan DP, da Silva MR, Soong TW, Fontaine B, Donaldson MR, Kung AW, Jongjaroenprasert W, Liang MC, Khoo DH, Cheah JS, Ho SC, Bernstein HS,

- Maciel RM, Brown RH Jr, Ptáček LJ. Mutations in potassium channel Kir2.6 cause susceptibility to thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 2010;**140**:88-98.
- Saenen JB, Labro AJ, Raes A, Snyders DJ. Modulation of HERG gating by a charge cluster in the N-terminal proximal domain. *Biophysical journal* 2006;**91**:4381-4391.
- Sagie A, Larson MG, Goldberg RJ, Bengtson JR, Levy D. An improved method for adjusting the QT interval for heart rate (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 1992;**70**:797-801.
- Saikawa T, Carmeliet E. Slow recovery of the maximal rate of rise (V_{\max}) of the action potential in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch* 1982;**394**:90-93.
- Sakabe NJ, Aneas I, Shen T, Shokri L, Park SY, Bulyk ML, Evans SM, Nobrega MA. Dual transcriptional activator and repressor roles of TBX20 regulate adult cardiac structure and function. *Hum Mol Genet* 2012;**21**:2194-2204.
- Sakmann B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K^+ channel in isolated pacemaker cells of mammalian heart. *Nature* 1983;**303**:250-253.
- Sale H, Wang J, O'Hara TJ, Tester DJ, Phartiyal P, He JQ, Rudy Y, Ackerman MJ, Robertson GA. Physiological properties of hERG 1a/1b heteromeric currents and a hERG 1b-specific mutation associated with Long-QT syndrome. *Circ Res* 2008;**103**:e81-95.
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;**96**:195-215.
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Delayed rectifier outward K^+ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 1991;**260**:H393-399.
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. Role of external Ca^{2+} and K^+ in gating of cardiac delayed rectifier K^+ currents. *Pflügers Arch* 1992;**420**:180-186.
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 1995;**81**:299-307.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* 1996;**384**:80-83.
- Sanguinetti MC. HERG1 channelopathies. *Pflügers Arch* 2010;**460**:265-276.
- Scamps F, Carmeliet E. Delayed K^+ current and external K^+ in single cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol* 1989;**257**:C1086-C1092.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 2000;**19**:332-340.
- Schönherr R, Heinemann SH. Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J Physiol* 1996;**493**:635-642.
- Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. The size of gating charge in wild-type and mutant *Shaker* potassium channels. *Science* 1992;**255**:1712-1715.
- Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002;**90**:939-950.
- Schwartz PJ, Moss AJ, Vincent GM, Crampton RS. Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update. *Circulation* 1993;**88**:782-784.
- Schwartz PJ, Priori SG, Locati EH, Napolitano C, Cantu F, Towbin JA, Keating MT, Hammoude H, Brown AM, Chen LS, Colatsky TJ. Long QT syndrome patients with mutations of the SCN5A and HERG genes have differential responses to Na^+ channel blockade and to increases in heart rate. Implications for gene-specific therapy. *Circulation* 1995;**92**:3381-3386.
- Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A, Austoni P, Bosi G, Giorgetti R, Grancini F, Marni ED, Perticone F, Rosti D, Salice P. Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 1998;**338**:1709-1714.
- Schwartz PJ. Clinical applicability of molecular biology: the case of the long QT syndrome. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2000;**1**:88-91.
- Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Watanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* 2001;**103**:89-95.

- Schwartz PJ, Priori SG, Cerrone M, Spazzolini C, Odero A, Napolitano C, Bloise R, De Ferrari GM, Klersy C, Moss AJ, Zareba W, Robinson JL, Hall WJ, Brink PA, Toivonen L, Epstein AE, Li C, Hu D. Left cardiac sympathetic denervation in the management of high-risk patients affected by the long-QT syndrome. *Circulation* 2004;**109**:1826-1833.
- Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L, Bathen J, Amlie JP, Timothy K, Shkolnikova M, Berul CI, Bitner-Glindzicz M, Toivonen L, Horie M, Schulze-Bahr E, Denjoy I. The Jervell and Lange-Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation* 2006;**113**:783-790.
- Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, Pedrazzini M, Besana A, Bosi G, Gabbarini F, Goulene K, Insolia R, Mannarino S, Mosca F, Nespole L, Rimini A, Rosati E, Salice P, Spazzolini C. Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2009;**120**:1761-1767.
- Schwartz PJ, Crotti L. QTc behavior during exercise and genetic testing for the long-QT syndrome. *Circulation* 2011;**124**:2181-2184.
- Schwartz PJ, Crotti L, Insolia R. Long-QT syndrome: from genetics to management. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;**5**:868-877.
- Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;**81**:133-176.
- Serodio P, Demiera EVS, Rudy B. Cloning of a novel component of A-type K⁺ channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 1996;**75**:2174-2179.
- Sesti F, Goldstein SA. Single-channel characteristics of wild-type IKs channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J Gen Physiol* 1998;**112**:651-663.
- Sesti F, Abbott GW, Wei J, Murray KT, Saksena S, Schwartz PJ, Priori SG, Roden DM, George AL Jr, Goldstein SA. A common polymorphism associated with antibiotic-induced cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:10613-10618.
- Seth R, Moss AJ, McNitt S, Zareba W, Andrews ML, Qi M, Robinson JL, Goldenberg I, Ackerman MJ, Benhorin J, Kaufman ES, Locati EH, Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Zhang L. Long QT syndrome and pregnancy. *J Am Coll Cardiol* 2007;**49**:1092-1098.
- Shah AK, Cohen IS, Datyner NB. Background K⁺ current in isolated canine cardiac Purkinje myocytes. *Biophys J* 1987;**52**:519-525.
- Shamgar L, Ma L, Schmitt N, Haitin Y, Peretz A, Wiener R, Hirsch J, Pongs O, Attali B. Calmodulin is essential for cardiac IKs channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circ Res* 2006;**98**:1055-1063.
- Shen W, Kurachi Y. Mechanisms of adenosine mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* 1995;**70**:274-291.
- Shen NV, Pfaffinger PJ. Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K⁺ channel subunit proteins. *Neuron* 1995;**14**:625-633.
- Shen T, Aneas I, Sakabe N, Dirschinger RJ, Wang G, Smemo S, Westlund JM, Cheng H, Dalton N, Gu Y, Boogerd CJ, Cai CL, Peterson K, Chen J, Nobrega MA, Evans SM. Tbx20 regulates a genetic program essential to adult mouse cardiomyocyte function. *J Clin Invest* 2011;**121**:4640-4654.
- Shibata EF, Drury T, Refsun H, Aldreter V, Giles WR. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol* 1989;**257**:H1773-H1781.
- Shimizu W, Ohe T, Kurita T, Shimomura K. Differential response of QTU interval to exercise, isoproterenol, and atrial pacing in patients with congenital long QT syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol* 1991;**14**:1966-1970.
- Shimizu W, Noda T, Takaki H, Kurita T, Nagaya N, Satomi K, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Sunagawa K, Echigo S, Nakamura K, Ohe T, Towbin JA, Napolitano C, Priori SG. Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long-QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2003;**41**:633-642.
- Shimizu W, Noda T, Takaki H, Nagaya N, Satomi K, Kurita T, Suyama K, Aihara N, Sunagawa K, Echigo S, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Nakamura K, Ohe T, Towbin JA, Priori SG, Kamakura S. Diagnostic value of epinephrine test for genotyping LQT1, LQT2, and LQT3 forms of congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2004;**1**:276-283.
- Showell C, Binder O, Conlon FL. T-box genes in early embryogenesis. *Dev Dyn* 2004;**229**:201-218.
- Shryock JC, Song Y, Rajamani S, Antzelevitch C, Belardinelli L. The arrhythmogenic consequences of increasing late INa in the cardiomyocyte. *Cardiovasc Res* 2013;**99**:600-611.
- Shy D, Gillet L, Abriel H. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim Biophys Acta*. 2013;**1833**:886-94.

- Siegelbaum SA, Tsien RW, Kass RS. Role of intracellular calcium in the transient outward current of calf Purkinje fibers. *Nature* 1977;**269**:611-613.
- Sigworth FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 1994;**27**:1-40.
- Singh MK, Christoffels VM, Dias JM, Trowe MO, Petry M, Schuster-Gossler K, Burger A, Ericson J, Kispert A. Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2. *Development* 2005;**132**:2697-2707.
- Singh R, Horsthuis T, Farin HF, Grieskamp T, Norden J, Petry M, Wakker V, Moorman AF, Christoffels VM, Kispert A. Tbx20 interacts with smads to confine tbx2 expression to the atrioventricular canal. *Circ Res* 2009;**105**:442-452.
- Skibsbjerg L, Poulet C, Diness JG, Bentzen BH, Yuan L, Kappert U, Matschke K, Wettwer E, Ravens U, Grunnet M, Christ T, Jespersen T. Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria. *Cardiovasc Res* 2014;**103**:156-167.
- Skinner JR, Winbo A, Abrams D, Vohra J, Wilde AA. Channelopathies That Lead to Sudden Cardiac Death: Clinical and Genetic Aspects. *Heart Lung Circ* 2019;**28**:22-30.
- Smith PL, Baukrowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996;**379**:833-836.
- Smith PL, Yellen G. Fast and slow voltage sensor movements in HERG potassium channels. *J Gen Physiol* 2002;**119**:275-293.
- Smith JL, Anderson CL, Burgess DE, Elayi CS, January CT, Delisle BP. Molecular pathogenesis of long QT syndrome type 2. *J Arrhythm* 2016;**32**:373-380.
- Snutch TP, Leonard JP, Gilbert MM, Lester HA, Davidson N. Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;**87**:3391-3395.
- Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart: Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 1993;**101**:513-543.
- Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:377-390.
- Sokolova O, Kolmakova-Partensky L, Grigorieff N. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure* 2001;**9**:215-220.
- Song MR, Shirasaki R, Cai CL, Ruiz EC, Evans SM, Lee SK, Pfaff SL. T-Box transcription factor Tbx20 regulates a genetic program for cranial motor neuron cell body migration. *Development* 2006;**133**:4945-4955.
- Song SJ, Mao XG, Wang C, Han AG, Yan M, Xue XY. LGR5/GPR49 is implicated in motor neuron specification in nervous system. *Neurosci Lett* 2015;**584**:135-140.
- Spazzolini C, Mullally J, Moss AJ, Schwartz PJ, McNitt S, Ouellet G, Fugate T, Goldenberg I, Jons C, Zareba W, Robinson JL, Ackerman MJ, Benhorin J, Crotti L, Kaufman ES, Locati EH, Qi M, Napolitano C, Priori SG, Towbin JA, Vincent GM. Clinical implications for patients with long QT syndrome who experience a cardiac event during infancy. *J Am Coll Cardiol* 2009;**54**:832-837.
- Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the IKr channel. *J Gen Physiol* 1996;**107**:611-619.
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000;**102**:1178-1185.
- Stanfield PR, Nakajima S, Nakajima Y. Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K⁺ channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002;**145**:47-179.
- Starkus JG, Kuschel L, Rayner MD, Heinemann SH. Ion conduction through C-type inactivated Shaker channels. *J Gen Physiol* 1997;**110**:539-50.
- Steinberg C, Padfield GJ, Al-Sabeq B, Adler A, Yeung-Lai-Wah JA, Kerr CR, Deyell MW, Andrade JG, Bennett MT, Yee R, Klein GJ, Green M, Laksman ZW, Krahn AD, Chakrabarti S. Experience with bisoprolol in long-QT1 and long-QT2 syndrome. *J Interv Card Electrophysiol* 2016;**47**:163-170.
- Stennard FA, Costa MW, Elliott DA, Rankin S, Haast SJ, Lai D, McDonald LP, Niederreither K, Dolle P, Bruneau BG, Zorn AM, Harvey RP. Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev Biol* 2003;**262**:206-224.
- Stennard FA, Costa MW, Lai D, Biben C, Furtado MB, Solloway MJ, McCulley DJ, Leimena C, Preis JI, Dunwoodie SL, Elliott DE, Prall OW, Black BL,

Fatkin D, Harvey RP. Murine T-box transcription factor Tbx20 acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation. *Development* 2005;**132**:2451-2462.

Stennard FA, Harvey RP. T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development* 2005;**132**:4897-4910.

Su Z, Limberis J, Souers A, Kym P, Mikhail A, Houseman K, Diaz G, Liu X, Martin RL, Cox BF, Gintant GA. Electrophysiologic characterization of a novel hERG channel activator. *Biochem Pharmacol* 2009;**77**:1383-1390.

Sutherland-Deveen ME, Wang T, Lamothe SM, Tschirhart JN, Guo J, Li W, Yang T, Du Y, Zhang S. Differential regulation of hERG current and expression by activation of protein kinase C. *Mol Pharmacol* 2019.

Suzuki T, Takeuchi J, Koshiba-Takeuchi K, Ogura T. Tbx genes specify posterior digit identity through Shh and BMP signaling. *Dev Cell* 2004;**6**:43-53.

Sy RW, van der Werf C, Chattha IS, Chockalingam P, Adler A, Healey JS, Perrin M, Gollob MH, Skanes AC, Yee R, Gula LJ, Leong-Sit P, Viskin S, Klein GJ, Wilde AA, Krahn AD. Derivation and validation of a simple exercise-based algorithm for prediction of genetic testing in relatives of LQTS probands. *Circulation* 2011;**124**:2187-2194.

Takeuchi JK, Mileikowska M, Koshiba-Takeuchi K, Heidt AB, Mori AD, Arruda EP, Gertsenstein M, Georges R, Davidson L, Mo R. Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development* 2005;**132**:2463-2474.

Takigawa M, Kawamura M, Noda T, Yamada Y, Miyamoto K, Okamura H, Satomi K, Aiba T, Kamakura S, Sakaguchi T, Mizusawa Y, Itoh H, Horie M, Shimizu W. Seasonal and circadian distributions of cardiac events in genotyped patients with congenital long QT syndrome. *Circ J* 2012;**76**:2112-2118.

Tamargo J. Drug-induced torsades de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn J Pharmacol* 2000;**83**:1-19.

Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:9-33.

Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Delpón E. $I_{Kur}/Kv1.5$ channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;**18**:399-416.

Tao X, Avalos JL, Chen J, MacKinnon R. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K⁺ channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 2009;**326**:1668-1674.

Taran LM, Szilagyi N. The duration of the electrical systole, Q-T, in acute rheumatic carditis in children. *Am Heart J* 1947;**33**:14-26.

Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Vedamoorthy S, Oduru S, Gyorke I, Williams SC, Gyorke S. Protein protein interactions between triadin and calsequestrin are involved in modulation of sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes. *J Physiol* 2007;**583**:71-80.

Terlau H, Heinemann SH, Stuhmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 1991;**293**:93-96.

Tester DJ, Ackerman MJ. Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies? *Cardiovasc Res* 2005;**67**:388-396.

Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2005;**2**:507-517.

Tester DJ, Cronk LB, Carr JL, Schulz V, Salisbury BA, Judson RS, Ackerman MJ. Allelic dropout in long QT syndrome genetic testing: a possible mechanism underlying false-negative results. *Heart Rhythm* 2006;**3**:815-821.

Tester DJ, Ackerman MJ. Genetics of long QT syndrome. *Methodist Deakey Cardiovasc J* 2014;**10**:29-33.

Thomas D, Zhang W, Wu K, Wimmer AB, Gut B, Wendt-Nordahl G, Kathofer S, Kreye VA, Katus HA, Schoels W, Kiehn J, Karle CA. Regulation of HERG potassium channel activation by protein kinase C independent of direct phosphorylation of the channel protein. *Cardiovasc Res* 2003;**59**:14-26.

Thomas D, Wu K, Wimmer AB, Zitron E, Hammerling BC, Kathofer S, Lueck S, Bloehs R, Kreye VA, Kiehn J, Katus HA, Schoels W, Karle CA. Activation of cardiac human ether-a-go-go related gene potassium currents is regulated by alpha(1A)-adrenoceptors. *J Mol Med (Berl)* 2004;**82**:826-837.

Thomas D, Karle CA, Kiehn J. The cardiac hERG/IKr potassium channel as pharmacological target: structure, function, regulation, and clinical applications. *Curr Pharm Des* 2006;**12**:2271-2283.

- Titus SA, Warmke JW, Ganetzky B. The *Drosophila* erg K⁺ channel polypeptide is encoded by the seizure locus. *J Neurosci* 1997;**17**:875-881.
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. How far will you go to sense voltage? *Neuron* 2005;**48**:719-725.
- Trautwein W, Uchizono K. Electron microscopic and electrophysiologic study of the pacemaker in the sinoatrial node of the rabbit heart. *Zellforsch Mikrosk Anat* 1963;**61**:96-109.
- Trippel DL, Gillette PC. Atenolol in children with ventricular arrhythmias. *Am Heart J* 1990;**119**:1312-1316.
- Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu YH, Ptacek LJ, Tawil R. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* 2002;**110**:381-388.
- Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC. Structural determinants and biophysical properties of HERG and KCNQ1 channel gating. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:27-35.
- Tristani-Firouzi M, Etheridge SP. Kir 2.1 channelopathies: the Andersen-Tawil syndrome. *Pflugers Arch* 2010;**460**:289-294.
- Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA. HERG, a human inward rectifier in the voltage gated potassium channel family. *Science* 1995;**269**:92-95.
- Tseng GN. I(Kr): the hERG channel. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:835-849.
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 1988;**11**:431-438.
- Tucker SJ, Pessia M, Adelman JP. Muscarine-gated K⁺ channel: Subunit stoichiometry and structural domains essential for G protein stimulation. *Am J Physiol* 1996;**271**:H379-H385.
- Tuteja D, Xu D, Timofeyev V, Lu L, Sharma D, Zhang Z, Xu Y, Nie L, Vazquez AE, Young JN, Glatter KA, Chiamvimonvat N. Differential expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels SK1, SK2, and SK3 in mouse atrial and ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**289**:H2714-2723.
- Tuteja D, Rafizadeh S, Timofeyev V, Wang S, Zhang Z, Li N, Mateo RK, Singapuri A, Young JN, Knowlton AA, Chiamvimonvat N. Cardiac small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C termini of the channels. *Circ Res* 2010;**107**:851-859.
- Tutor AS, Delpon E, Caballero R, Gomez R, Nunez L, Vaquero M, Tamargo J, Mayor F, Jr., Penela P. Association of 14-3-3 proteins to beta1-adrenergic receptors modulates Kv11.1 K⁺ channel activity in recombinant systems. *Mol Biol Cell* 2006;**17**:4666-4674.
- Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kvβ2.1 subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:2406-2412.
- Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester DJ, Vatta M, Farrugia G, Ackerman MJ, Makielski JC. Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;**105**:9355-9360.
- Undrovinas AI, Shander GS, Makielski JC. Cytoskeleton modulates gating of voltage-dependent sodium channel in heart. *Am J Physiol* 1995;**269**:H203-H214.
- Utrilla RG, Nieto-Marín P, Alfayate S, Tinaquero D, Matamoros M, Pérez-Hernández M, Sacristán S, Ondo L, de Andrés R, Díez-Guerra FJ, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Kir2.1-Nav1.5 Channel Complexes Are Differently Regulated than Kir2.1 and Nav1.5 Channels Alone. *Front Physiol* 2017;**8**:903.
- Valenzuela C, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ. Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J* 1995;**69**:418-427.
- Valdivia CR, Tester D, Rok BA, Porter CB, Munger TM, Jahangir A, Makielski JC, Ackerman M. A trafficking defective, Brugada syndrome-causing SCN5A mutation rescued by drugs. *Cardiovasc Res* 2004;**62**:53-62.
- Vandenberg CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**:2560-2564.
- Vandenberg JI, Torres AM, Campbell TJ, Kuchel PW. The HERG K⁺ channel: progress in understanding the molecular basis of its unusual gating kinetics. *Eur Biophys J* 2004;**33**:89-97.
- Vandenberg JI, Perry MD, Perrin MJ, Mann SA, Ke Y, Hill AP. hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev* 2012;**92**:1393-1478.

- Vandenberg JI, Perozo E, Allen TW. Towards a Structural View of Drug Binding to hERG K(+) Channels. *Trends Pharmacol Sci* 2017;**38**:899-907.
- Varro A, Nanasi PP, Lathrop DA. Potassium currents in isolated human atrial and ventricular cardiocytes. *Acta Physiol Scand* 1993;**149**:133-142.
- Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* 2006;**114**:2104-2112.
- Vecoli C, Pulignani S, Foffa I, Andreassi MG. Congenital heart disease: the crossroads of genetics, epigenetics and environment. *Curr Genomics* 2014;**15**:390-399.
- Veerman CC, Kosmidis G, Mummery CL, Casini S, Verkerk AO, Bellin M. Immaturity of human stem-cell-derived cardiomyocytes in culture: fatal flaw or soluble problem? *Stem Cells Dev* 2015;**24**:1035-1052.
- Vereecke J, Carmeliet E. The effect of external pH on the delayed rectifying K⁺ current in cardiac ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 2000;**439**:739-751.
- Verheijck EE, van Ginneken AC, Bourier J, Bouman LN. Effects of delayed rectifier current blockade by E-4031 on impulse generation in single sinoatrial nodal myocytes of the rabbit. *Circ Res* 1995;**76**:607-615.
- Verkerk AO, Veerman CC, Zegers JG, Mengarelli I, Bezzina CR, Wilders R. Patch-Clamp Recording from Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Improving Action Potential Characteristics through Dynamic Clamp. *Int J Mol Sci* 2017;**18**:1873.
- Vincent GM, Schwartz PJ, Denjoy I, Swan H, Bithell C, Spazzolini C, Crotti L, Piippo K, Lupoglazoff JM, Villain E, Priori SG, Napolitano C, Zhang L. High efficacy of beta-blockers in long-QT syndrome type 1: contribution of noncompliance and QT-prolonging drugs to the occurrence of beta-blocker treatment "failures". *Circulation* 2009;**119**:215-221.
- Virag L, Iost N, Opincariu M, Szolnok J, Szecsi J, Bogats G, Szenohradszky P, Varro A, Papp JG. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001;**49**:790-797.
- Viskin S. Cardiac pacing in the long QT syndrome: review of available data and practical recommendations. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;**11**:593-600.
- Viskin S, Postema PG, Bhuiyan ZA, Rosso R, Kalman JM, Vohra JK, Guevara-Valdivia ME, Marquez MF, Kogan E, Belhassen B, Glikson M, Strasberg B, Antzelevitch C, Wilde AA. The response of the QT interval to the brief tachycardia provoked by standing: a bedside test for diagnosing long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2010;**55**:1955-1961.
- Volders PG, Sipido KR, Vos MA, Späthens RL, Leunissen JD, Carmeliet E, Wellens HJ. Downregulation of delayed rectifier K(+) currents in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsades de pointes. *Circulation* 1999;**100**:2455-2461.
- Vyas H, Hejlik J, Ackerman MJ. Epinephrine QT stress testing in the evaluation of congenital long QT syndrome: Diagnostic accuracy of the paradoxical response. *Heart Rhythm* 2005;**2**:S102.
- Waddell-Smith KE, Ertresvaag KN, Li J, Chaudhuri K, Crawford JR, Hamill JK, Haydock D, Skinner JR. Physical and Psychological Consequences of Left Cardiac Sympathetic Denervation in Long-QT Syndrome and Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2015;**8**:1151-1158.
- Walton, M., & Fozzard, H. A. The relation of V_{max} to I_{Na}, G_{Na}, and h infinity in a model of the cardiac Purkinje fiber. *Biophys J* 1979;**25**:407-420.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993;**73**:1061-1076.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994;**28**:1540-1546.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995;**80**:805-811.
- Wang XJ, Reynolds ER, Déak P, Hall LM. The seizure locus encodes the Drosophila homolog of the HERG potassium channel. *J Neurosci* 1997;**17**:882-890.
- Wang J, Trudeau MC, Zappia AM, Robertson GA. Regulation of deactivation by an amino terminal domain in human ether-à-go-go-related gene potassium channels. *J Gen Physiol* 1998;**112**:637-647.
- Wang J, Myers CD, Robertson GA. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K⁺ channel. *J Gen Physiol* 2000;**115**:749-758.

- Wang GS, Hong CJ, Yen TY, Huang HY, Ou Y, Huang TN, Jung WG, Kuo TY, Sheng M, Wang TF, Hsueh YP. Transcriptional modification by a CASK-interacting nucleosome assembly protein. *Neuron* 2004;**42**:113-128.
- Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, Chai J. Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 2007;**10**:32-39.
- Wang T, Hogan-Cann A, Kang Y, Cui Z, Guo J, Yang T, Lamothe SM, Li W, Ma A, Fisher JT, Zhang S. Muscarinic receptor activation increases hERG channel expression through phosphorylation of ubiquitin ligase Nedd4-2. *Mol Pharmacol* 2014;**85**:877-886.
- Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B. A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science* 1991;**252**:1560-1562.
- Warmke JW, Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:3438-3442.
- Watanabe S, Kusama-Eguchi K, Kobayashi H, Igarashi K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem* 1991;**266**:20803-20809.
- Weerapura M, Nattel S, Chartier D, Caballero R, Hebert TE. A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol* 2002;**540**:15-27.
- Wei H, Wu J, Liu Z. Studying KCNQ1 Mutation and Drug Response in Type 1 Long QT Syndrome Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Methods Mol Biol* 2018;**1684**:7-28.
- Weidmann S. The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 1955;**127**:213-224.
- Westenbroek RE, Bischoff S, Fu Y, Maier SK, Catterall WA, Scheuer T. Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry. *J Mol Cell Cardiol* 2013;**64**:69-78.
- Westenskow P, Splawski I, Timothy KW, Keating MT, Sanguinetti MC. Compound mutations: a common cause of severe long-QT syndrome. *Circulation* 2004;**109**:1834-1841.
- Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 1994;**75**:473-482.
- Whicher JR, MacKinnon R. Structure of the voltage gated K⁺ channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. *Science* 2016;**353**:664-669.
- Wible BA, Wang L, Kuryshev YA, Basu A, Haldar S, Brown AM. Increased K⁺ efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3 β in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002;**277**:17852-12862.
- Wickman K, Nemec J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 1998;**20**:103-114.
- Wilde AA, Jongbloed RJ, Doevendans PA, Duren DR, Hauer RN, van Langen IM, van Tintelen JP, Smeets HJ, Meyer H, Geelen JL. Auditory stimuli as a trigger for arrhythmic events differentiate HERG-related (LQTS2) patients from KVLQT1-related patients (LQTS1). *J Am Coll Cardiol* 1999;**33**:327-332.
- Wilde AA. Long QT syndrome: a double hit hurts more. *Heart Rhythm* 2010;**7**:1419-1420.
- Wilde AA, Moss AJ, Kaufman ES, Shimizu W, Peterson DR, Benhorin J, Lopes C, Towbin JA, Spazzolini C, Crotti L, Zareba W, Goldenberg I, Kanter JK, Robinson JL, Qi M, Hofman N, Tester DJ, Bezzina CR, Alders M, Aiba T, Kamakura S, Miyamoto Y, Andrews ML, McNitt S, Polonsky B, Schwartz PJ, Ackerman MJ. Clinical Aspects of Type 3 Long-QT Syndrome: An International Multicenter Study. *Circulation* 2016;**134**:872-882.
- Wilde AAM, Amin A. Channelopathies, genetic testing and risk stratification. *Int J Cardiol* 2017;**237**:53-55.
- Windle JR, Geletka RC, Moss AJ, Zareba W, Atkins DL. Normalization of ventricular repolarization with flecainide in long QT syndrome patients with SCN5A:DeltaKPQ mutation. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2001;**6**:153-158.
- Wu G, Ai T, Kim JJ, Mohapatra B, Xi Y, Li Z, Abbasi S, Purevjav E, Samani K, Ackerman MJ, Qi M, Moss AJ, Shimizu W, Towbin JA, Cheng J, Vatta M. α -1-syntrophin mutation and the long-QT syndrome: a disease of sodium channel disruption. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:193-201.
- Wu J, Lipsius S. Effects of extracellular Mg²⁺ on T- and L-Type Ca²⁺ currents in single atrial myocytes. *Am J Physiol* 1990;**259**:H1842-H1850.
- Wu W, Gardner A, Sanguinetti MC. Cooperative subunit interactions mediate fast C-type inactivation of hERG1 K⁺ channels. *J Physiol* 2014;**592**:4465-4480.

- Xiang FL, Guo M, Yutzey KE. Overexpression of Tbx20 in Adult Cardiomyocytes Promotes Proliferation and Improves Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circulation* 2016;**133**:1081-1092.
- Xu J, Yu W, Jan YN, Jan LY, Li M. Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the α -subunits. *J Biol Chem* 1995;**270**:24761-24768.
- Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, Xu D, Zhang Y, Rodriguez J, Nie L, Tuxson HR, Young JN, Glatter KA, Vazquez AE, Yamoah EN, Chiamvimonvat N. Molecular identification and functional roles of a $\text{Ca}(2+)\text{-activated K}^+$ channel in human and mouse hearts. *J Biol Chem* 2003;**278**:49085-49094.
- Xu X, Kanda VA, Choi E, Panaghie G, Roepke TK, Gaeta SA, Christini DJ, Lerner DJ, Abbott GW. MinK-dependent internalization of the IKs potassium channel. *Cardiovascular research* 2009;**82**:430-438.
- Yager J, Richards S, Hekmat-Scafe DS, Hurd DD, Sundaresan V, Caprette DR, Saxton WM, Carlson JR, Stern M. Control of Drosophila perineurial glial growth by interacting neurotransmitter-mediated signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:10445-10450.
- Yan DH, Nishimura K, Yoshida K, Nakahira K, Ehara T, Igarashi K, Ishihara K. Different intracellular polyamine concentrations underlie the difference in the inward rectifier K^+ currents in atria and ventricles of the guinea-pig heart. *J Physiol* 2005;**563**:713-724.
- Yang NB, Horn R. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channel. *Neuron* 1995;**15**:213-218.
- Yang T, Kupersmidt S, Roden DM. Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K^+ current. *Circ Res* 1995;**77**:1246-1253.
- Yang T, Snyders DJ, Roden DM. Rapid inactivation determines the rectification and $[\text{K}^+]_o$ dependence of the rapid component of the delayed rectifier K^+ current in cardiac cells. *Circ Res* 1997;**80**:782-789.
- Yang B, Kumar S. Nedd4 and Nedd4-2: closely related ubiquitin-protein ligases with distinct physiological functions. *Cell Death Differ* 2010;**17**:68-77.
- Yang Y, Yang Y, Liang B, Liu J, Li J, Grunnet M, Olesen S-P, Rasmussen HB, Ellinor PT, Gao L. Identification of a Kir3.4 mutation in congenital long QT syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 2010;**86**:872-880.
- Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Reviews* 1998;**50**:723-757.
- Yarbrough TL, Lu T, Lee HC, Shibata EF. Localization of cardiac sodium channels in caveolin-rich membrane domains: regulation of sodium current amplitude. *Circ Res* 2002;**90**:443-449.
- Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K^+ channel. *Science* 1991;**251**:939-942.
- Yellen G, Sodickson D, Chen TY, Jurman ME. An engineered cysteine in the external mouth of a K^+ channel allows inactivation to be modulated by metal binding. *Biophys J* 1994;**66**:1068-1075.
- Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002;**419**:35-42.
- Yeola SW, Rich TC, Uebele VN, Tamkun MM, Snyders DJ. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K^+ channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res* 1996;**78**:1105-1114.
- Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;**274**:C25-C37.
- Yu SP, Kerchner GA. Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 1998;**52**:612-617.
- Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:6047-6052.
- Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology* 2003;**4**:207.1-207.7.
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009;**324**:797-801.
- Yuan W, Ginsburg K, Bers D. Comparison of sarcolemmal Ca^{2+} channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol* 1986;**493**:733-746.
- Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Restoration of inactivation in mutants of *Shaker* potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 1990;**250**:568-571.

- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 2003;**425**:200-205.
- Zaklyazminskaya EV, Abriel H. Prevalence of significant genetic variants in congenital long QT syndrome is largely underestimated. *Front Pharmacol* 2012;**3**:72.
- Zamorano-Leon JJ, Yanez R, Jaime G, Rodriguez-Sierra P, Calatrava-Ledrado L, Alvarez-Granada RR, Mateos-Caceres PJ, Macaya C, Lopez-Farre AJ. KCNH2 gene mutation: a potential link between epilepsy and long QT-2 syndrome. *J Neurogenet* 2012;**26**:382-386.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;**101**:25-33.
- Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev* 2015;**67**:821-870.
- Zaritsky JJ, Redell JB, Tempel BL, Schwarz TL. The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K⁺ current (*I_{K1}*) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J Physiol* 2001;**533**:697-710.
- Zeng H, Lozinskaya IM, Lin Z, Willette RN, Brooks DP, Xu X. Mallotoxin is a novel human ether-a-go-go-related gene (hERG) potassium channel activator. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;**319**:957-962.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 1994;**372**:97-100.
- Zhang L, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Fox J, Giuli LC, Shen J, Splawski I, Priori SG, Compton SJ, Yanowitz F, Benhorin J, Moss AJ, Schwartz PJ, Robinson JL, Wang Q, Zareba W, Keating MT, Towbin JA, Napolitano C, Medina A. Spectrum of ST-T-wave patterns and repolarization parameters in congenital long-QT syndrome: ECG findings identify genotypes. *Circulation* 2000;**102**:2849-2855.
- Zhang M, Jiang M, Tseng GN. MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as β subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 2001;**88**:1012-1019.
- Zhang Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z. Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG) K⁺ channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem* 2003;**278**:10417-10426.
- Zhang M, Liu J, Tseng GN. Gating charges in the activation and inactivation processes of the HERG channel. *J Gen Physiol* 2004;**124**:703-718.
- Zhang XD, Timofeyev V, Li N, Myers RE, Zhang DM, Singapuri A, Lau VC, Bond CT, Adelman J, Lieu DK, Chiamvimonvat N. Critical roles of a small conductance Ca(2)(+)-activated K(+) channel (SK3) in the repolarization process of atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 2014;**101**:317-325.
- Zhou J, Jeron A, London B, Han X, Koren G. Characterization of a slowly inactivating outward current in adult mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 1998a;**83**:806-814.
- Zhou Z, Gong Q, Epstein ML, January CT. HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem* 1998b;**273**:21061-21066.
- Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 2001;**411**:657-661.
- Zhou Y, MacKinnon R. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol* 2003;**333**:965-975.
- Zhou PZ, Babcock J, Liu LQ, Li M, Gao ZB. Activation of human ether-a-go-go related gene (hERG) potassium channels by small molecules. *Acta Pharmacol Sin* 2011;**32**:781-788.
- Zou A, Xu QP, Sanguinetti MC. A mutation in the pore region of HERG K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes reduces rectification by shifting the voltage dependence of inactivation. *J Physiol* 1998;**509**:129-137.
- Zuhlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 1999;**399**:159-162.

X. Publicaciones

Los resultados presentados en esta TESIS DOCTORAL están publicados en el artículo:

Caballero R*, Utrilla RG*, Amorós I, Matamoros M, Pérez-Hernández M, Tinaquero D, Alfayate S, Nieto-Marín P, Guerrero-Serna G, Liu QH, Ramos-Mondragón R, Ponce-Balbuena D, Herron T, Campbell KF, Filgueiras-Rama D, Peinado R, López-Sendón JL, Jalife J, Delpón E, Tamargo J. Tbx20 controls the expression of the KCNH2 gene and of hERG channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:E416-E425.

Tbx20 controls the expression of the *KCNH2* gene and of hERG channels

Ricardo Caballero^{a,b,1}, Raquel G. Utrilla^{a,b,1}, Irene Amorós^{a,b}, Marcos Matamoros^{a,b}, Marta Pérez-Hernández^{a,b}, David Tinaquero^{a,b}, Silvia Alfayate^{a,b}, Paloma Nieto-Marín^{a,b}, Guadalupe Guerrero-Serna^{c,d}, Qing-hua Liu^{c,d}, Roberto Ramos-Mondragón^{c,d}, Daniela Ponce-Balbuena^{c,d}, Todd Herron^{c,d}, Katherine F. Campbell^{c,d}, David Filgueiras-Rama^{e,2}, Rafael Peinado^{b,e}, José L. López-Sendón^{b,e}, José Jalife^{c,d,f}, Eva Delpón^{a,b,3,4}, and Juan Tamargo^{a,b,3}

^aDepartment of Pharmacology, School of Medicine, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain; ^bCentro de Investigación Biomédica en Red (CIBER), Spain; ^cDepartment of Internal Medicine, Center for Arrhythmia Research, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109; ^dDepartment of Molecular and Integrative Physiology, Center for Arrhythmia Research, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109; ^eDepartment of Cardiology, Hospital Universitario La Paz, Instituto de Investigación Sanitaria La Paz (IdiPaz), 28046 Madrid, Spain; and ^fCardiac Arrhythmia Department, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), 28029 Madrid, Spain

Edited by Richard W. Aldrich, The University of Texas at Austin, Austin, TX, and approved November 23, 2016 (received for review July 27, 2016)

Long QT syndrome (LQTS) exhibits great phenotype variability among family members carrying the same mutation, which can be partially attributed to genetic factors. We functionally analyzed the *KCNH2* (encoding for Kv11.1 or hERG channels) and *TBX20* (encoding for the transcription factor Tbx20) variants found by next-generation sequencing in two siblings with LQTS in a Spanish family of African ancestry. Affected relatives harbor a heterozygous mutation in *KCNH2* that encodes for p.T152HfsX180 Kv11.1 (hERG). This peptide, by itself, failed to generate any current when transfected into Chinese hamster ovary (CHO) cells but, surprisingly, exerted “chaperone-like” effects over native hERG channels in both CHO cells and mouse atrial-derived HL-1 cells. Therefore, heterozygous transfection of native (WT) and p.T152HfsX180 hERG channels generated a current that was indistinguishable from that generated by WT channels alone. Some affected relatives also harbor the p.R311C mutation in Tbx20. In human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs), Tbx20 enhanced human *KCNH2* gene expression and hERG currents (I_{hERG}) and shortened action-potential duration (APD). However, Tbx20 did not modify the expression or activity of any other channel involved in ventricular repolarization. Conversely, p.R311C Tbx20 did not increase *KCNH2* expression in hiPSC-CMs, which led to decreased I_{hERG} and increased APD. Our results suggest that Tbx20 controls the expression of hERG channels responsible for the rapid component of the delayed rectifier current. On the contrary, p.R311C Tbx20 specifically disables the Tbx20 protranscriptional activity over *KCNH2*. Therefore, *TBX20* can be considered a *KCNH2*-modifying gene.

Tbx20 | hERG channels | long QT syndrome | cardiomyocytes | human induced pluripotent stem cells

Long QT syndrome (LQTS) is characterized by abnormal prolongation of the QT interval of the electrocardiogram (ECG) and is due to delayed ventricular repolarization. LQTS increases the occurrence of ventricular tachyarrhythmias, particularly torsade de pointes, leading to recurrent syncope, seizures, ventricular fibrillation, and sudden cardiac death (SCD) (1). At least 15 genes have been reported in autosomal-dominant forms of LQTS (1). However, mutations in *KCNQ1* (LQT1), *KCNH2* (LQT2), and *SCN5A* (LQT3) represent the most frequent forms of LQTS (~90%) (1, 2). *KCNH2* encodes Kv11.1, or hERG, channels, which generate the rapid component of the delayed rectifier current (I_{Kr}) responsible for ventricular repolarization in humans (3). In a Spanish family of African ancestry suffering LQTS, we identified a frameshift and a missense mutation in *KCNH2* that were assumed to be the disease-causing mutations. However, in some family members, we also identified a missense mutation in *TBX20* coding for the transcription factor Tbx20, which is necessary in early stages of heart development (4). Importantly, results in flies and mice demonstrated that Tbx20 is also required for maintaining adult heart function (5, 6).

Here we have tested the *KCNH2* and *TBX20* mutations to establish whether they can account for prolongation of repolarization. Our results demonstrated that more than “one hit” is necessary to give rise to LQTS in the affected relatives. Moreover, data reveal that the peptide resulting from the *KCNH2* frameshift mutation exerts chaperone-like effects by increasing the membrane expression of WT hERG channels. Conversely, the p.R311C Tbx20 mutation specifically and markedly decreases *KCNH2* expression. Therefore, our genetic and functional studies suggest that Tbx20 controls the expression of hERG channels in human myocytes and, thus, *TBX20* may be considered a *KCNH2*-modifying gene.

Results

The proband (II:4; Fig. 1A) was a 41-y-old male who experienced syncope when he got out of bed. The ECG showed sinus rhythm at 68 beats per min (bpm) with normal PR (168 ms) and QRS (88 ms) but with a low-amplitude and wide T wave (Fig. 1B). Bazett-corrected QT value (QTc) was 480 ms. Echocardiography, exercise

Significance

Tbx20 is a transcription factor whose critical role in cardiogenesis is well-established. Here we functionally analyzed the electrophysiological effects produced by a mutation (p.R311C) in Tbx20 found in some affected individuals belonging to a family with long QT syndrome (an inherited cardiac arrhythmia due to delayed ventricular repolarization). We demonstrated that Tbx20 selectively increases the expression of *KCNH2*, which encodes for the channel Kv11.1 (hERG) that generates the main ventricular repolarizing current. Conversely, the p.R311C mutation disables the Tbx20 protranscriptional activity over *KCNH2*, leading to a decrease in the hERG current and a prolongation of the action potentials recorded in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Therefore, we propose that Tbx20, besides its described role, regulates *KCNH2* expression.

Author contributions: R.C., J.J., E.D., and J.T. designed research; R.C., R.G.U., I.A., M.M., M.P.-H., D.T., S.A., P.N.-M., G.G.-S., Q.-h.L., R.R.-M., D.P.-B., T.H., K.F.C., J.J., E.D., and J.T. performed research; D.F.-R., R.P., and J.L.L.-S. conducted clinical evaluation of family members; R.C., R.G.U., I.A., M.M., M.P.-H., D.T., S.A., P.N.-M., G.G.-S., Q.-h.L., R.R.-M., D.P.-B., J.J., E.D., and J.T. analyzed data; and R.C., J.J., E.D., and J.T. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

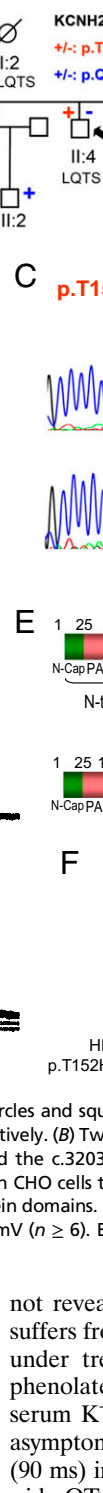
¹R.C. and R.G.U. contributed equally to this work.

²Present address: Cardiac Arrhythmia Department, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), 28029 Madrid, Spain.

³E.D. and J.T. contributed equally to this work.

⁴To whom correspondence should be addressed. Email: edelpon@med.ucm.es.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1612383114/-DCSupplemental.



test, and Holter were completely normal. Thereafter, bisoprolol treatment was started. No new episodes have been documented to date. Evaluation of the family identified two sisters who died suddenly: one at age 19, in the postpartum period (II:2), and another at age 17 (II:5). Both had been diagnosed with epilepsy and treated with phenobarbital until death. Interestingly, II:2, who exhibited a QTc of 440 ms, underwent an adrenaline test that was negative.

Sister II:1 also presented syncopal episodes since she was 13, when she was diagnosed with epilepsy and treated with phenobarbital. After a syncopal episode at rest, the ECG showed a QTc of 560 ms, and ECG monitoring documented a polymorphic ventricular tachycardia. At age 43, she experienced an aborted SCD despite atenolol treatment (50 mg twice daily) and pacemaking at 75 bpm with a dual chamber pacemaker (DDD). Thereafter, a dual-chamber cardioverter defibrillator (ICD) was implanted. She has been asymptomatic since then.

Sister II:3 has no cardiac symptoms. Her ECG showed sinus rhythm at 68 bpm with normal PR, QRS, and QTc values. Echocardiography, ergometry, Holter, and adrenaline test did

Sister II:3 has no cardiac symptoms. Her ECG showed sinus rhythm at 68 bpm with normal PR, QRS, and QTc values. Echocardiography, ergometry, Holter, and adrenaline test did

not reveal any structural disease or arrhythmias. However, she suffers from lupus with a mild decrease of kidney function and is under treatment with prednisone, hydroxychloroquine, mycophenolate, and spironolactone (25 mg daily). Her most recent serum K^+ concentration was 5.2 mEq per L. Sister II:6 is also asymptomatic; her ECG showed normal PR (140 ms) and QRS (90 ms) intervals but sinus bradycardia (48 bpm) and low-voltage wide QT waves (QTc 460 ms) (Fig. S1). An adrenaline test was positive: on ECG the QTc was prolonged to 618 ms, and there were T-wave amplitude alternans (Fig. S1) and polymorphic ventricular extrasystoles. Therefore, an ICD was implanted and bisoprolol treatment was started. The proband's mother (66 y old), who had previously been asymptomatic with a normal ECG, was also diagnosed with LQTS after an aborted SCD episode during antibiotic therapy (piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin, and tobramycin) in the context of chemotherapy (idarubicin and cytarabine) for the treatment of acute leukemia. An ICD was implanted but she died shortly thereafter from the leukemia. The proband's father is still alive, asymptomatic, and with a normal

ECG. The proband has two nephews (Fig. 14). III:1 was studied (ECG, echocardiography, ergometry, and Holter) when he was a child; the results revealed an electrically and structurally normal heart. Afterward, an adrenaline test was conducted that was negative when he was 23 y old. Conversely, III:2 has experienced epileptic crises since he was 2 y old. He has been treated with oxcarbazepine since he was 6 y old, and no new episodes have been documented (he is 14 now). His ECG, Holter, echocardiogram, and stress test are normal.

KCNH2 Variants and Functional Analysis. Next-generation sequencing of 82 genes (Table S1) demonstrated that the proband and sister II:1 carried a heterozygous frameshift mutation in the *KCNH2* gene (NM_000238.3:c.453dupC) (Fig. 1C) encoding for p.T152HfsX180 hERG. This variant is also present in sister II:6. Sisters II:1 and II:3 and both nephews carry another variant in the *KCNH2* gene (NM_000238.3:c.3203A>G) encoding for p.Q1068R hERG (Fig. 1C). Because recombination is a very rare event after fertilization, expression of the p.T152HfsX180 mutation in one allele and p.Q1068R in the other allele is more likely to represent the condition of sister II:1 (compound heterozygosity).

p.Q1068R is considered a “rare control” variant (7) that appears with a 0.03% frequency in the African population (Table S2). Functional analysis has demonstrated that the p.Q1068R mutation accelerates both inactivation and recovery from inactivation, whose time constants suffer ~10- to 20-mV shifts in their voltage dependence (8). However, the p.Q1068R variant has not been considered pathogenic by itself (7). In contrast, p.T152HfsX180 hERG is a 332-aa peptide (Fig. 1E) that we considered to be highly pathogenic and responsible for the LQTS in this family. Thus, we conducted a functional analysis by transfecting CHO cells with cDNA encoding either WT ($n = 7$) or p.T152HfsX180 hERG ($n = 6$) channels (1 μ g). hERG channels generated a slowly activating current whose amplitude progressively increased with pulses up to 0 mV and then progressively decreased at potentials >0 mV owing to the fast C-type inactivation (9), resulting in the bell-shaped current density–voltage curve typical of hERG channels (Fig. 2A). Fig. 1D shows that, as expected, p.T152HfsX180 hERG channels did not generate any current. To simulate the heterozygous condition of all of the mutation carriers, cells ($n = 17$) were transfected with WT plus p.T152HfsX180 hERG channels (0.5 + 0.5 μ g). Surprisingly, maximum current amplitudes generated by depolarizing pulses (Fig. 2A) and tail currents recorded upon repolarization to –60 mV (Figs. 1F and 2B) were not statistically different from those generated by WT hERG channels (1 μ g) ($P > 0.05$). We surmised that the p.T152HfsX180 hERG peptide could exert a “chaperone-like” effect by increasing membrane expression of WT hERG channels. In fact, Fig. 1F demonstrates that addition of the peptide (0.5 μ g) to hERG WT (0.5 μ g) generated significantly greater currents than those generated by hERG channels alone ($P < 0.05$). Furthermore, p.T152HfsX180 hERG did not modify the voltage dependence of hERG activation (Fig. 2B) but slowed deactivation (Table S3). To confirm this chaperone-like effect, we transfected mouse atrial-derived HL-1 cells with the p.T152HfsX180 hERG. Some HL-1 cells (36%) exhibited I_{Kr} as the main repolarizing current (I_{Kr} -predominant cells), whereas in other cells (36%) I_{Kr} overlapped with the slow component of the delayed rectifier current (I_{Ks}) (intermediate cells). Thus, I_{Kr} was measured in I_{Kr} -predominant and -intermediate cells as the dofetilide-sensitive current, because it was completely inhibited by this selective *Kr* blocker (1 μ mol/L) (10). Fig. 2C demonstrates that p.T152HfsX180 hERG significantly increases both the maximum and tail amplitudes of I_{Kr} ($P < 0.05$). Furthermore, the tail current increase and the slowing of tail current deactivation depended on the amount of cDNA transfected (Fig. 2D and F and Table S3).

We used a previously validated in silico model of the human ventricular action potential (AP) (11) to test for the effects of the heterozygous p.T152HfsX180 hERG mutation. The model was run

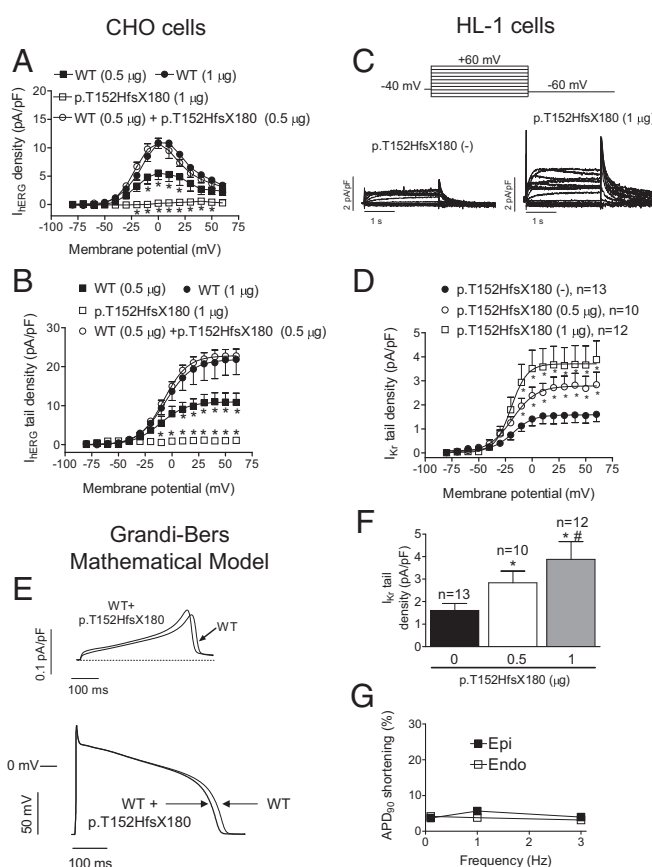


Fig. 2. (A and B) Maximum current density (current density–voltage relationships) (A) and tail currents (activation curves) (B) generated by WT and p.T152HfsX180 hERG channels alone or when they are cotransfected in CHO cells, as a function of the membrane potential. In B, solid lines represent the fit of a Boltzmann equation. * $P < 0.05$ vs. hERG WT (1 μ g) ($n \geq 6$). (C) I_{Kr} traces recorded in I_{Kr} -predominant HL-1 cells transfected or not with p.T152HfsX180 hERG. (D) I_{Kr} tail current densities recorded in HL-1 cells transfected or not with p.T152HfsX180 hERG. (E) Simulated I_{Kr} traces (Top) and APs (Bottom) obtained at 0.1 Hz by using the Grandi-Bers mathematical model of human ventricular endocardial cells by introducing the modifications produced by p.T152HfsX180 hERG on the I_{Kr} . (F) I_{Kr} tail current densities recorded in HL-1 cells transfected or not with p.T152HfsX180 hERG after pulses to +60 mV. (G) Percentage of APD₉₀ shortening in APs simulated at different frequencies in epicardial and endocardial cells. Points/bars represent mean \pm SEM of the data. In D and F, n , number of cells; * $P < 0.05$ vs. nontransfected cells; # $P < 0.05$ vs. p.T152HfsX180 0.5 μ g transfected cells.

for endocardial and epicardial cells at different frequencies ranging between 0.1 and 3 Hz. The voltage- and time-dependent characteristics of currents generated by WT+p.T152HfsX180 hERG channels were incorporated into the model to simulate mutation effects. Fig. 2E shows superimposed human endocardial APs driven at 0.1 Hz generated by WT and WT+p.T152HfsX180 hERG channels. As can be observed, the duration of the heterologous mutant case AP (APD; action-potential duration) was slightly briefer. Furthermore, APD measured at 90% of repolarization (APD₉₀) of simulated WT+p.T152HfsX180 endocardial and epicardial cells was only slightly abbreviated (~3%) at either driving frequency (Fig. 2G).

Overall, these results suggested that the heterozygous p.T152HfsX180 hERG mutation produced subtle effects over the I_{Kr} , even when confirmation on a more physiological setting is needed.

TBX20 Mutation and Functional Analysis. Next-generation sequencing of the proband also identified the heterozygous mutation NM_001077653.2:c.931C>T at the *TBX20* gene (Table S2), which was confirmed by Sanger analysis (Fig. 3B). The mutation leads to

the substitution of Arg311 by Cys (p.R311C Tbx20). Arg311, which is highly conserved among different species (Fig. 3C), is located in the transactivation region of Tbx20 (Fig. 3D). Two affected (II:6 and III:2) and another unaffected (II:3) of the proband's relatives also carry the p.R311C Tbx20 mutation (Fig. 3A). The p.R311C Tbx20 variation was annotated with a 0.01% frequency in Africans. Other nonsynonymous variants identified in the proband are listed in Table S2.

Tbx20 binds to the consensus sequence "AGGTGTG" within the DNA of target genes (6). We hypothesized that Tbx20 might regulate the expression of cardiac ion channels involved in the control of human cardiac repolarization as it does in fly and mouse adult hearts (5, 6). Sequence analysis of mouse and human promoters of genes encoding ion-channel subunits revealed that a Tbx20 binding site appears in both *KCNH2* genes (Table S4). Thus, we aimed at identifying the effects of WT and p.R311C Tbx20 on the expression of hERG in HL-1 cells by recording I_{Kr} . Transfection with WT (60.8 ± 7.2 pF, $n = 72$) or p.R311C Tbx20 (65.6 ± 9.4 pF, $n = 65$) plasmids did not modify HL-1 cell capacitance (55.2 ± 9.0 pF, $n = 68$) ($P > 0.05$).

Fig. 3E shows dofetilide-sensitive currents recorded in I_{Kr} -predominant HL-1 cells. I_{Kr} was recorded again in I_{Kr} -predominant and -intermediate HL-1 cells whose distribution percentages

(39% and 33%, respectively) were not modified by Tbx20. Tbx20 WT significantly increased ($P < 0.05$) the maximum outward current recorded upon depolarization (Figs. 3E and 4A) without modifying the activation kinetics (Table S3). Tbx20 also significantly increased the I_{Kr} tail density (Figs. 3E and 4B) ($P < 0.05$), whereas it did not modify tail current deactivation (Table S3). Surprisingly, p.R311C Tbx20 was unable to increase maximum outward I_{Kr} (Figs. 3E and 4A) and the tail current density elicited upon repolarization (Figs. 3E and 4B). Consistently, the mutated transcription factor did not modify either the activation or the deactivation kinetics of the current (Table S3) ($P > 0.05$). Importantly, p.R311C Tbx20 did not change the percentage of I_{Kr} -predominant and -intermediate HL-1 cells (39% and 28%, respectively). Fig. 4B and C demonstrate that transfection with Tbx20, either WT or mutated, did not significantly modify the voltage dependence of K_r channel activation (Table S3). Western blot analysis in HL-1 cells showed that WT Tbx20 significantly increased ($n = 5$, $P < 0.05$), whereas p.R311C Tbx20 significantly decreased, the expression of hERG channels (Fig. 4D and F) ($n = 5$, $P < 0.05$). It has been proposed that MiRP1 encoded by *KCNE2* is also present in the channels generating the I_{Kr} in the human heart (12). Fig. 4E and G demonstrate that Tbx20, either WT or mutated, did not modify MiRP1 expression in HL-1 cells.

To further demonstrate the transcriptional effect of Tbx20 over the mouse *KCNH2* gene, the I_{Kr} density was also assessed in HL-1 cells, in which endogenous Tbx20 was silenced using lentiviral constructs containing short hairpin RNA (shRNA) for Tbx20 together with GFP. Control cells were infected with a lentivirus containing a scrambled shRNA and GFP. At 48 h postinfection, Tbx20 expression decreased by 58% (Fig. S2). The results demonstrated that the I_{Kr} density significantly decreased in Tbx20-silenced cells (Fig. S2) ($n \geq 5$, $P < 0.05$).

To test whether Tbx20 regulates the expression of human *KCNH2*, we measured the luciferase activity in HL-1 cells expressing the minimum human *KCNH2* promoter. The luciferase assay demonstrated that Tbx20 WT, but not p.R311C, significantly increased ($P < 0.05$) the transcription of the human *KCNH2* gene (Fig. 4H) ($n = 8$ dishes per group). Similarly, SP1, a transcription factor whose binding site is also present in the minimal promoter of the human *KCNH2* gene, significantly increased the transcription of this gene (Fig. 4H) ($n = 8$, $P < 0.05$). We also tested the effects of the combined action of both forms of Tbx20 (WT and mutated). Fig. 4H shows that in the joint presence of WT and p.R311C Tbx20 the protranscriptional effect was reduced ($n = 3$, $P < 0.05$ vs. Tbx20 alone), probably because of a competition between the WT and mutated forms for the Tbx20 consensus binding site in the *KCNH2* minimal promoter. Interestingly, p.R311C Tbx20 alone did not decrease basal luciferase activity, probably because the sensitivity of our system is limited. The mouse *KCNE2* gene promoter does not exhibit the Tbx20 binding site, whereas the human gene does (Table S3). Unfortunately, it was not possible to construct the minimal human promoter of the *KCNE2* gene for a luciferase assay.

To test for the effects of the Tbx20 mutation on human ventricular AP characteristics, again the mathematical model was used. Fig. 4I shows superimposed human endocardial APs driven at 0.1 Hz in control conditions and when cells were transfected with *TBX20* either WT or mutated. Tbx20 WT shortened the APD measured at 50% of repolarization (APD₅₀) and the APD₉₀ as a consequence of an I_{Kr} increase (Fig. 4I, Top). Conversely, p.R311C Tbx20 prolonged the APD₅₀ (by 25% compared with Tbx20 WT) and APD₉₀ (by 23%), due to the decrease of the I_{Kr} conductance (Fig. 4I, Top).

Effects of Tbx20 in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. Next, we determined the effects of the Tbx20 p.R311C mutation on I_{Kr} and AP characteristics in a more

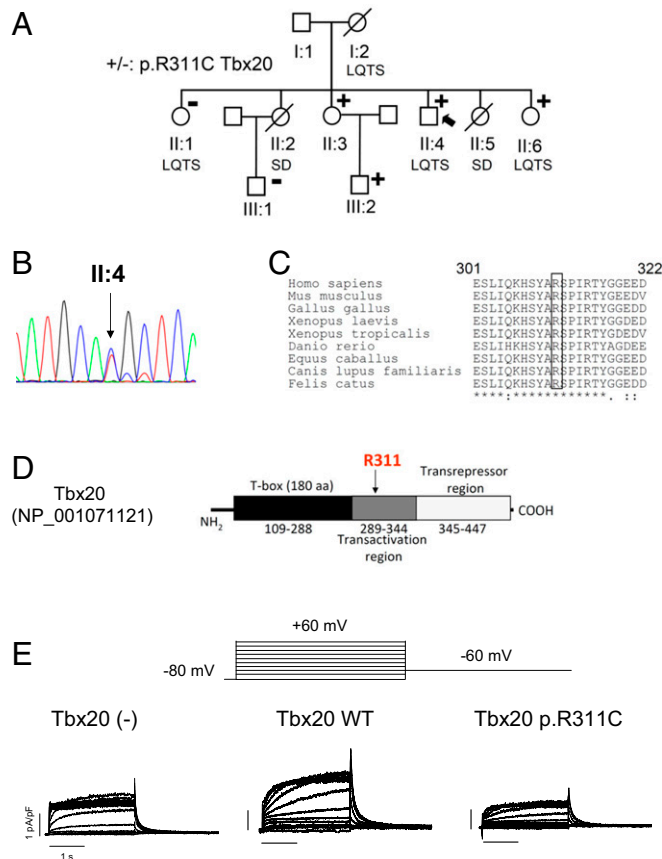


Fig. 3. (A) Pedigree of the studied family. The arrow indicates the proband. Circles and squares represent females and males, respectively. + and – represent subjects with and without the p.R311C Tbx20 mutation, respectively. (B) DNA sequence chromatograms of the proband depicting the heterozygous change (c.931C>T) of the *TBX20* gene. (C) Sequence alignment of the region surrounding R311 in Tbx20 in several species. The box highlights the conservation of this residue. (D) Schematic representation of the Tbx20 sequence, indicating the T box, and the transactivation and transrepressor regions. (E) I_{Kr} traces recorded in I_{Kr} -predominant HL-1 cells transfected or not with either WT or p.R311C Tbx20 by applying the pulse protocol (Top).

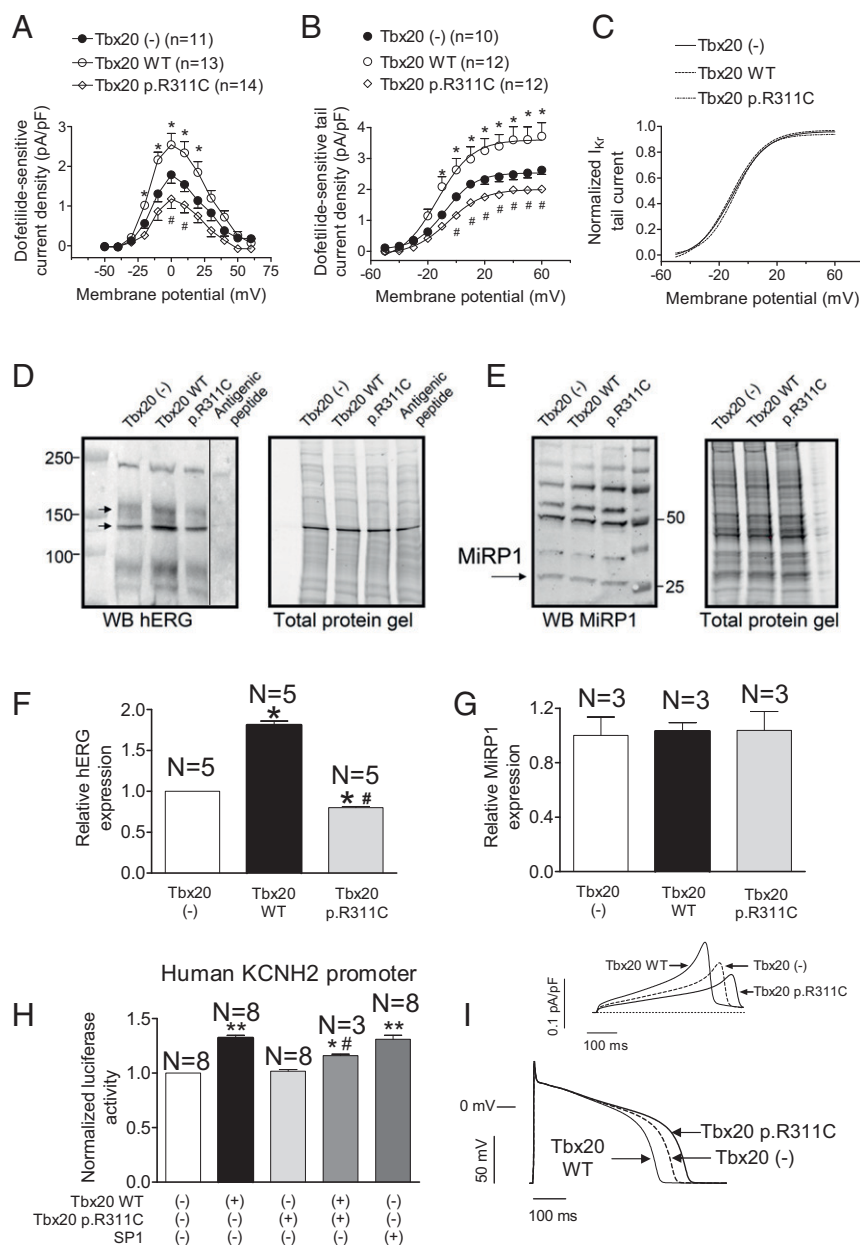


Fig. 4. (A and B) Maximum I_{Kr} density–voltage relationships (A) and activation curves (B) for currents recorded in I_{Kr} -predominant and -intermediate HL-1 cells transfected or not with either WT or p.R311C Tbx20. (C) Normalized activation curves for currents recorded in the three experimental groups. In B and C, solid lines represent the fit of a Boltzmann equation. (D and E) Western blot (WB) images and their corresponding stain-free gels showing hERG (arrows in D) and miRP1 (E) expression in HL-1 cells transfected or not with either WT or p.R311C Tbx20. In D, the sample of the last right lane was run in the same gel but was separated (continuous line) when incubating with the primary antibody together with the antigenic peptide. (F and G) Mean densitometric analysis of hERG (F) and miRP1 (G) levels normalized to total protein. (H) Normalized luciferase activity in HL-1 cells expressing the pLightSwitch_Prom vector carrying the human *KCNH2* promoter cotransfected or not with SP1 and either WT or p.R311C Tbx20. (I) Simulated I_{Kr} traces (Top) and APs (Bottom) obtained at 0.1 Hz by using the Grandi-Bers mathematical model of human ventricular endocardial cells by introducing the modifications produced by Tbx20 WT and p.R311C on the I_{Kr} . Points/bars represent mean \pm SEM of the data. n , number of cells; N , number of dishes. * $P < 0.05$ vs. Tbx20 (-); # $P < 0.05$ vs. Tbx20 WT; ** $P < 0.01$ vs. Tbx20 (-).

physiologically relevant setting. Unfortunately, genetically modified mice were not an option, because adult mouse heart does not generate I_{Kr} (12). Therefore, we drew upon human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) infected or not with lentiviral constructs encoding Tbx20 WT or mutated. I_{Kr} was measured as the dofetilide-sensitive current (1 μ mol/L). Fig. 5A shows I_{Kr} tail currents recorded at -60 mV after depolarizing pulses from -60 mV to -40 and +60 mV in a noninfected hiPSC-CM. Tbx20 WT produced a 1.6-fold increase in I_{Kr} tail current density ($P < 0.05$), whereas Tbx20 p.R311C

reduced the tail current density by ~60% ($P < 0.05$ vs. Tbx20 WT and noninfected cells; $n \geq 7$) (Fig. 5B). Tbx20, either WT or p.R311C, did not modify the voltage dependence of K_r channel activation (Table S3). APs were recorded in hiPSC-CMs that exhibited automatic activity (13). In cells infected with Tbx20 WT ($n = 10$), maximum diastolic potential and AP amplitude averaged -68.4 ± 1.9 and 98.7 ± 14.2 mV, respectively. At 1 Hz, APD₅₀ and APD₉₀ were 108.1 ± 17.4 and 163.2 ± 23.2 ms, respectively, and Tbx20 WT shortened whereas Tbx20 p.R311C significantly prolonged the APD₉₀ (Fig. 5C) ($n = 10$, $P < 0.01$).

Furthermore, as shown in Fig. 5D, the prolongation of the APD₉₀ was greater at slow- (158% at 0.1 Hz) than at fast-driving frequencies (102% at 2 Hz).

To reproduce the genetic condition of the proband, the mathematical model was run considering both the heterozygous p.T152HfsX180 hERG mutation together with the p.R311C Tbx20 mutation. Fig. 5E demonstrated that p.R311C Tbx20 would lengthen the APD in the presence of the p.T152HfsX180 hERG mutation. Furthermore, the prolongation was greater in endocardial than in epicardial cells and also at slow- than at fast-driving frequencies (Fig. 5F).

Effects of p.R311C on the Expression of Other Cardiac K Channels. In the human ventricular myocardium Kv7.1 (encoded by *KCNQ1*) homotetramers associate with minK proteins (encoded by *KCNE1*) to form the channels that generate I_{Ks} (14). Some HL-1 cells (27%) exhibit I_{Ks} as the main repolarizing current (I_{Ks} -predominant cells). Thus, I_{Ks} was measured in I_{Ks} -predominant and -intermediate cells as dofetilide-resistant current, which was completely inhibited by a selective Ks channel blocker (HMR-1556; 1 μ mol/L) (10). Fig. 6A shows I_{Ks} traces recorded in I_{Ks} -predominant cells transfected with WT or mutated Tbx20. Neither WT nor mutant Tbx20 modified the I_{Ks} density ($n \geq 6$, $P > 0.05$) (Fig. 6B). Moreover, neither modified the percentage of I_{Ks} -predominant or -intermediate cells (28% and

33% in the presence of WT and p.R311C Tbx20, respectively). Consistently, Tbx20 did not modify either the voltage dependence of Ks channel activation or the activation and deactivation kinetics (Table S3). Western blot analysis (Fig. S3) confirmed that WT and p.R311C Tbx20 were not able to modify the expression of Kv7.1 channels (Fig. 6C) ($n \geq 3$, $P > 0.05$). Sequence analysis of the mouse *KCNQ1* gene promoter demonstrated that there are two Tbx20 consensus binding sites far away from the transcription start site (-2474 and -1992) (Table S4). Importantly, human *KCNQ1* lacks the Tbx20 binding site (Table S4). Consistently, neither WT nor p.R311C Tbx20 modified the expression of human *KCNQ1* measured with a luciferase assay (Fig. 6E). Conversely, SP1, whose consensus binding site is present in the minimal promoter of the human gene (16), actually increased *KCNQ1* transcription significantly (Fig. 6E). Human and mouse *KCNE1* gene promoters exhibit consensus Tbx20 binding sites (Table S4) and, indeed, both WT and p.R311C Tbx20 significantly increased minK expression (Fig. 6D) in HL-1 cells and transcription as measured by luciferase assay (Fig. 6F).

Neither human, rat, nor mouse *KCNJ2* gene promoters (which encode for the inward rectifier K^+ channel Kir2.1) exhibit the Tbx20 consensus binding site (Table S4). Fig. 6G and Fig. S3 demonstrate that Kir2.1 protein expression was not modified by the presence of any of the forms of Tbx20 ($n = 3$ dishes per group, $P > 0.05$). However, even when Kir2.1 channels were expressed,

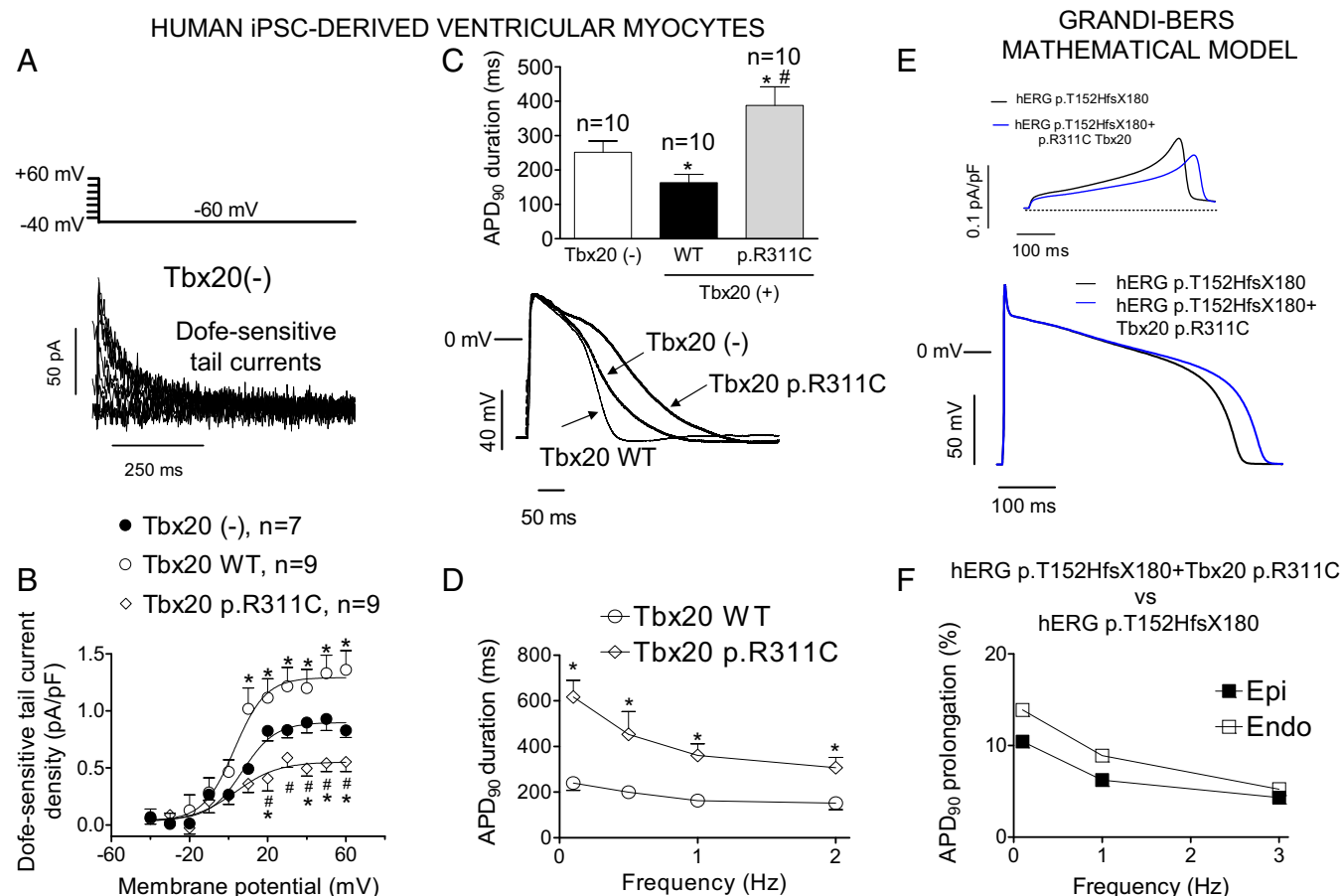


Fig. 5. (A) Dofetilide (1 μ mol/L)-sensitive (I_{Kr}) tail currents obtained by digital subtraction in a noninfected hiPSC-derived cardiomyocytes. (B) I_{Kr} density in a hiPSC-derived cardiomyocyte infected or not with either WT or p.R311C Tbx20. Solid lines represent the fit of a Boltzmann equation. (C) Superimposed APs recorded at 1 Hz in three hiPSC-derived cardiomyocytes infected or not with either WT or p.R311C Tbx20. (Top) The APD₉₀ of each experimental group. (D) APD₉₀ at different stimulation frequencies in cells infected with Tbx20 WT or p.R311C. (E) Simulated I_{Kr} traces (Top) and APs (Bottom) obtained at 0.1 Hz by using the Grandi-Bers mathematical model of human ventricular endocardial cells by introducing the modifications produced by heterozygous p.T152HfsX180 hERG alone or in combination with p.R311C Tbx20 on the I_{Kr} . (F) Percentage of APD₉₀ prolongation in APs simulated at different frequencies in epicardial and endocardial cells. In B–D, points/bars represent mean \pm SEM of ≥ 7 experiments in each group. * $P < 0.05$ vs. Tbx20(-); # $P < 0.05$ vs. Tbx20 WT.

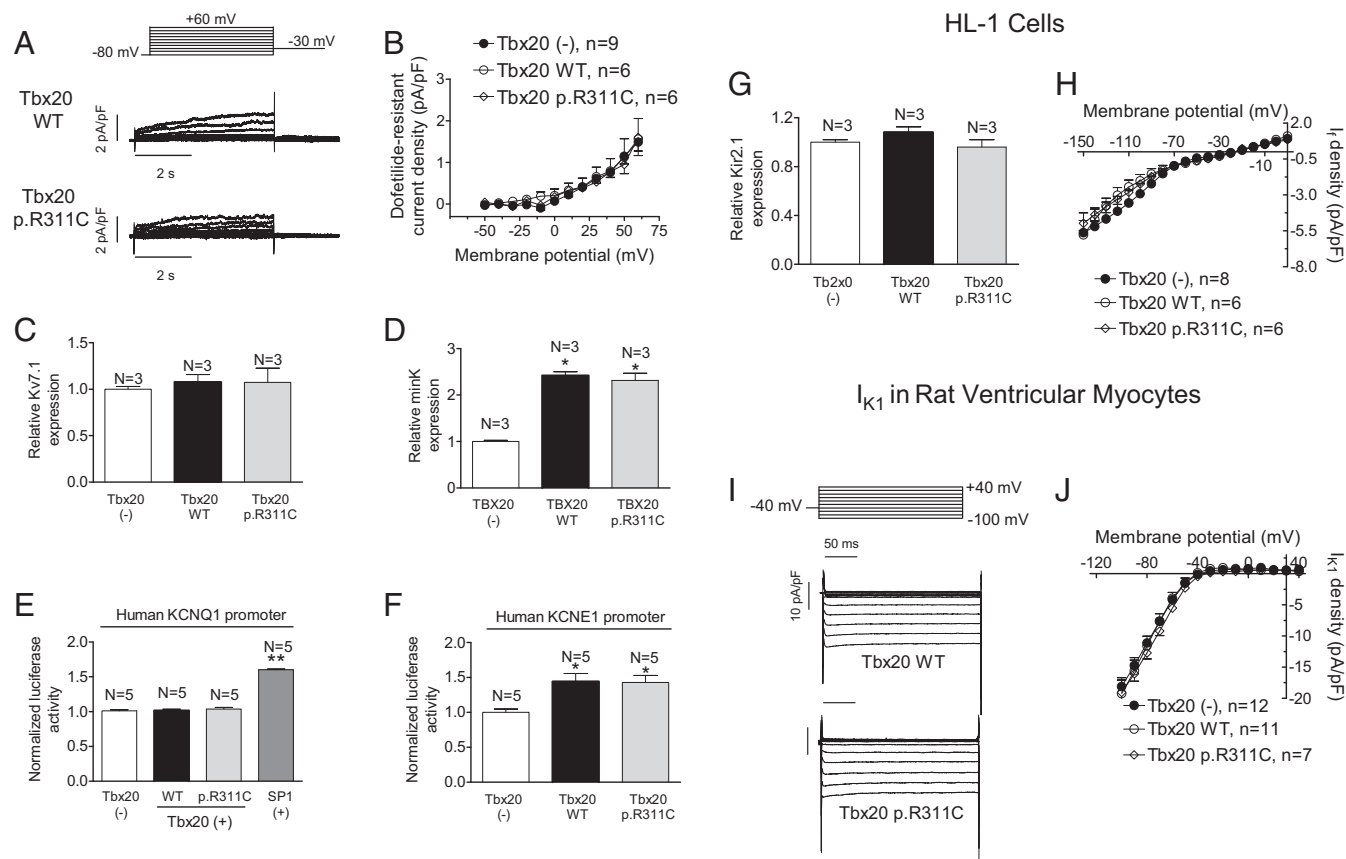


Fig. 6. (A) Traces of dofetilide-resistant current (I_{Ks}) recorded in I_{Ks} -predominant HL-1 cells transfected with WT or p.R311C Tbx20 by applying the pulse protocol (Top). (B) Current density-voltage relationships for I_{Ks} recorded in HL-1 cells transfected or not with WT or p.R311C Tbx20. (C and D) Mean densitometric analysis of Kv7.1 (C) and minK (D) levels normalized to total protein. (E and F) Normalized luciferase activity in HL-1 cells expressing the pLightSwitch_Prom vector carrying the human *KCNQ1* (E) or *KCNE1* (F) promoters cotransfected or not with WT or p.R311C Tbx20. (G) Mean densitometric analysis of Kir2.1 levels normalized to total protein. (H) Current density-voltage relationships for I_{K1} recorded in HL-1 cells transfected or not with WT or p.R311C Tbx20. (I) I_{K1} traces recorded in two rat myocytes infected with WT and p.R311C Tbx20. (J) Mean current density-voltage curves for I_{K1} recorded in rat ventricular myocytes infected or not with lentiviral constructs encoding WT and p.R311C Tbx20. Each point/bar represents mean \pm SEM of n cells or N dishes of cells in each group. * $P < 0.05$ vs. Tbx20 (-); ** $P < 0.01$ vs. Tbx20 (-).

the inward rectifier K current (I_{K1}) could not be recorded in HL-1 cells. Instead, the pacemaker current (I_f) predominated at potentials between -150 and 0 mV but its current density-voltage relation was unaltered by either WT or p.R311C Tbx20 (Fig. 6H) ($n \geq 6$, $P > 0.05$). This result agrees with the absence of a Tbx20 consensus binding site in the promoters of the genes (*HCN1*, *HCN3*, and *HCN4*) encoding the channels underlying I_f in mice and humans (Table S4). Therefore, to assess the role of Tbx20 in Kir2.1 functional regulation, the I_{K1} was recorded in enzymatically dissociated rat ventricular myocytes that were transfected using a lentiviral construct (17). Fig. 6I and J show that the I_{K1} density was not modified at any of the voltages tested in the presence of either WT or p.R311C Tbx20 ($n \geq 7$, $P > 0.05$).

Effects of p.R311C on the Expression of Cardiac Na and Ca Channels. *SCN5A* and *CACNA1C* genes codify for the α -subunit of the Na^+ (Nav1.5) and L-type Ca^{2+} (Cav1.2) channels, respectively. Mouse and human *SCN5A* gene promoters lack a Tbx20 binding site (Table S4). Fig. 7A and B confirm that the Na^+ current (I_{Na}) density was also not modified by WT or p.R311C Tbx20 ($n \geq 8$, $P > 0.05$). Furthermore, transfection of WT or p.R311C Tbx20 did not modify the voltage dependence of the I_{Na} activation or inactivation or the current kinetics (Fig. 7C and Table S3). Fig. 7D and E show that Tbx20 WT or p.R311C did not modify the amplitude of the sustained influx of Na^+ measured at the end of 500-ms depolarizations

to -20 mV (I_{NaL}) ($n \geq 6$, $P > 0.05$). The human *SCN2B* promoter, which codifies for an Nav1.5 ancillary subunit, exhibits the Tbx20 binding site (Table S4). Luciferase assays demonstrated that Tbx20 WT and p.R311C were unable to modify human *SCN5A* gene expression, whereas Tbx20 WT, but not Tbx20 p.R311C, significantly increased the expression of human *SCN2B* (Fig. 7F and G).

The mouse, but not the human, *CACNA1C* gene promoter exhibits the Tbx20 binding site (Table S4). Therefore, Tbx20 effects on the L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}) were tested in both HL-1 cells and hiPSC-CMs. In HL-1 cells, I_{CaL} was measured using Ba^{2+} as a charge carrier (I_{Ba}) (15, 18). Fig. S4 shows that Tbx20, both WT and mutated, significantly increased the I_{Ba} ($n \geq 9$, $P < 0.05$). Furthermore, p.R311C Tbx20 increased the I_{Ba} density similar to Tbx20 WT ($P > 0.05$ vs. Tbx20 WT). However, neither WT nor mutated Tbx20 affected the voltage dependence of activation or inactivation of the channel (Fig. S4 and Table S3). Western blot analysis in HL-1 cells (Fig. S3) demonstrated that both WT and p.R311C Tbx20 significantly and similarly increase Cav1.2 expression (Fig. S4).

Fig. 8A shows I_{CaL} traces recorded in hiPSC-CMs infected or not with the lentiviral constructs encoding for Tbx20, either WT or mutated. Neither WT nor p.R311C Tbx20 modified the I_{CaL} density (Fig. 8A) at any of the voltages tested (Fig. 8B) ($n \geq 6$, $P > 0.05$). The luciferase assay done using the minimal human *CACNA1C* promoter

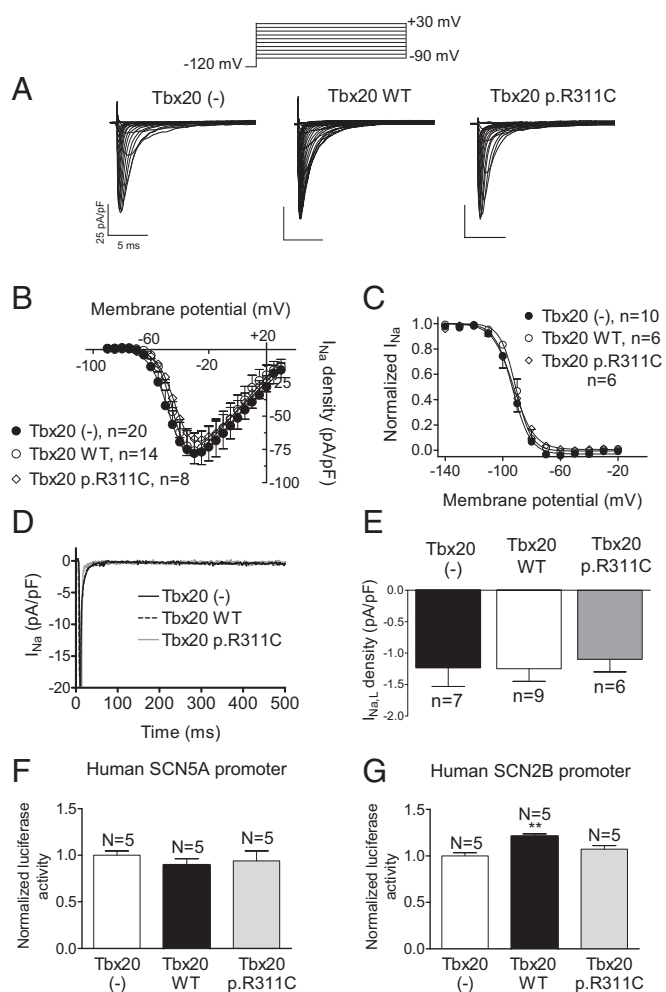


Fig. 7. (A) I_{Na} traces recorded in HL-1 cells transfected or not with WT or p.R311C Tbx20 by applying the pulse protocol (Top). (B and C) Current density-voltage relationships (B) and steady-state inactivation (C) for I_{Na} recorded in the three experimental groups. (D and E) Superimposed I_{Na} traces (D) recorded in HL-1 cells transfected or not with WT or p.R311C Tbx20 by applying 500-ms pulses from -120 to -20 mV and bar graph (E) showing the mean I_{NaL} recorded at 500 ms. (F and G) Normalized luciferase activity in HL-1 cells expressing the pLightSwitch_Prom vector carrying the human SCN5A (F) or SCN2B (G) promoters cotransfected or not with WT or p.R311C Tbx20. Each point/bar represents the mean \pm SEM of n cells or N dishes of cells in each group. $**P < 0.01$ vs. Tbx20 (-).

confirmed that Tbx20 WT and p.R311C were unable to modify the expression of the human *CACNA1C* gene (Fig. 8C), a result that explains the lack of Tbx20 effects over the human I_{CaL} density.

Functional Analysis of the c-66A>G Variation of *KCNN3*. The proband, sister II:6, and nephew III:1 also present a variation at the 5' UTR of the *KCNN3* gene (NM_001204087.1:c-66A>G) that encodes the α -subunit of the small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel type 3 (SK3) (19). Luciferase experiments demonstrated that expression of mutated *KCNN3* cannot be activated by SP1 or Tbx20 (Fig. S5), whose binding sites are present in the human gene promoter (Table S4). Therefore, the variation completely abolished its transcription, thus leading to a *KCNN3* haploinsufficiency. However, because treatment of human multicellular ventricular preparations with apamin (a selective SK blocker) does not modify the APD (20), the importance of these channels in repolarization seems to be negligible.

Discussion

Here we functionally describe the consequences of three variants identified in a Spanish family of African ancestry with LQTS. The *TBX20* mutation selectively decreased the expression of hERG channels, prolonging the AP in hiPSC-CMs. Conversely, the *KCNH2* frameshift mutation did not modify I_{Kr} density. Our results strongly suggest that, in the adult heart, Tbx20 controls the expression of hERG channels, and thus *TBX20* may be considered an LQTS-modifying gene.

The p.T152HfsX180 hERG mutation was found in the proband and in all of the affected relatives that were genotyped but in none of the nonaffected family members. Therefore, the mutation was considered pathogenic. Phenotypic manifestations in the family match most of the features of LQT2, and three of the proband's sisters experienced seizures since they were children. Epilepsy has been reported to be more common with LQT2 (39%) than with other subtypes (10%), possibly because *KCNH2* is also expressed in the brain (21). Interestingly, nephew III:2, who carries the *TBX20* but not the *KCNH2* frameshift mutation, has also experienced seizures. Additionally, one of the sisters died postpartum, which is a specific trigger of symptoms in LQT2 (22). Functional analysis of the p.T152HfsX180 mutation demonstrated that this peptide of 332 aa, of which only 152 correspond to the hERG sequence, exerts chaperone-like effects on WT hERG channels in CHO cells and on I_{Kr} recorded in HL-1 cells. Indeed, transfection of p.T152HfsX180 in HL-1 cells produces a "concentration-dependent" increase in I_{Kr} . As a consequence, current density generated by "heterozygous" transfection of WT and p.T152HfsX180 hERG channels was not different from that generated by "homozygous" transfection of WT hERG channels. This is a somewhat surprising result considering that, as expected, homozygous transfection of p.T152HfsX180 did not generate current at all. We recently demonstrated that the Nav1.5 N-terminal domain, by itself (the 132-aa peptide) (Nter), exerts a chaperone-like effect that increases I_{Na} and I_{K1} by enhancing the expression of Nav1.5 and Kir2.1-Kir2.2 channels in CHO cells and in rat cardiomyocytes (17). We hypothesize that the p.T152HfsX180 peptide is able to increase membrane expression of

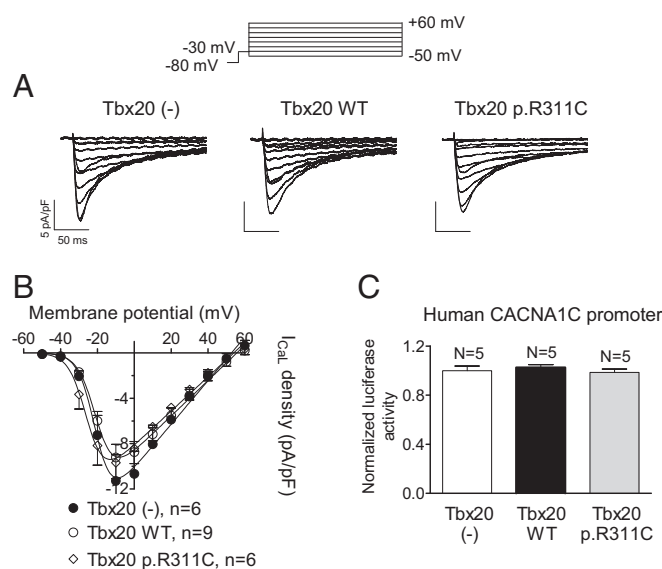


Fig. 8. (A) I_{CaL} traces recorded in hiPSC-CMs infected or not with WT or p.R311C Tbx20 by applying the pulse protocol (Top). (B) Current density-voltage relationships for I_{CaL} recorded in the three experimental groups. (C) Normalized luciferase activity in HL-1 cells expressing the pLightSwitch_Prom vector carrying the human *CACNA1C* promoter cotransfected or not with WT or p.R311C Tbx20. Each point/bar represents the mean \pm SEM of n cells or N dishes of cells in each group.

hERG channels. The molecular determinants, and the proteins involved in this effect, merit further analysis. The question now is whether this *KCNH2* frameshift mutation is, by itself, responsible for the LQT phenotype of the family.

The proband and relatives II:3, II:6, and III:2 harbor a mutation in the *TBX20* gene. Mutations in *Tbx20* have been previously described and lead to defects in cardiac septation, valvulogenesis, and chamber growth (23). Indeed, *Tbx20* is necessary for proper organogenesis, because it carries strong transcriptional activation and repression domains and physically interacts with other transcription factors involved in cardiac development (4). It is noteworthy that the R311 residue lies in the transcriptional activator domain but none of the mutation carriers presented any structural cardiac defect.

Functional analysis demonstrated that *Tbx20* does not directly control the expression of the channels that underlie I_{Na} , I_f , I_{K1} , and I_{Ks} . Regarding the I_{Ks} , the results demonstrated that both WT and mutated *Tbx20* increased minK expression. Therefore, in HL-1 cells, an I_{Ks} augmentation would have been expected, because minK increases $Kv7.1$ conductance (24, 25). However, simultaneously, minK acts as an endocytic chaperone favoring the internalization of the $Kv7.1$ –minK complexes expressed in the membrane (26), an effect that would decrease I_{Ks} density. Therefore, the balance between these two opposite actions could explain why the minK augmentation was not accompanied by a change in I_{Ks} density. Our results confirm previous data demonstrating that, in mice, *Tbx20* increases I_{CaL} (6). However, *Tbx20* did not increase the expression of human *CACNA1C*, because the canonical *Tbx20* binding site is not present in the gene promoter. Accordingly, *Tbx20*, either WT or mutated, did not modify the I_{CaL} in hiPSC-CMs. Our results demonstrated that *Tbx20* significantly increases the expression of hERG and thus I_{Kr} in HL-1 cells and hiPSC-CMs. Conversely, in adult flies, neuromancer (the invertebrate ortholog of *Tbx20*) negatively regulates the expression of the invertebrate homolog of the ERG channel (eag-like K^+ channel) (5). Moreover, functional analysis demonstrated in HL-1 cells and hiPSC-CMs strongly suggested that the p.R311C mutation specifically disables the protranscriptional activity of *Tbx20* on the *KCNH2* gene. Therefore, we propose that in the human adult myocardium, this *Tbx20* mutation leads to a prolongation of ventricular repolarization.

Results in flies and mice demonstrated that *Tbx20* is a key determinant of adult cardiac function (5, 6). Indeed, heart-specific knockdown of the gene that encodes neuromancer in flies (*nmr-2*) interferes with cardiac performance and disrupts contractile myofibrillar patterning (5). In adult mice, heterozygous loss of *TBX20* leads to dilated cardiomyopathy (27), and the conditional homozygous loss of *Tbx20* results in severe cardiomyopathy with associated arrhythmias and death (6). It has been proposed that, in the adult heart, *Tbx20* is the pivotal element of a transcriptional cohort (also constituted by *Mef2A*, *Tead1*, *Esrr*, and *Creb1*) that fine-tunes expression of continuously required proteins in response to the current myocyte state, availability of resources, and contractile requirements (6). Therefore, even when *Tbx20* mutant carriers apparently exhibit a mild phenotype under basal conditions, we cannot rule out that their myocardium adapts poorly to more demanding situations (e.g., sympathetic tone increase or even hormone- or drug-induced decrease of the repolarization reserve), because probably the p.R311C mutation affects *Tbx20* ability to coordinate adaptive responses of the transcriptional cohort. Therefore, the simultaneous presence of *KCNH2* and *TBX20* mutations probably contributes to the LQTS phenotype in this family.

As in other families (28), expressivity of the LQTS phenotype in this family ranged from the mild phenotype of the proband to the high symptomatic phenotype of sister II:1. Besides demographic variables such as gender and age, variable expressivity may be attributed to the concurrence of additional genetic

modifiers (29), including the presence of two or more variants, either in the same gene (compound heterozygosity) or in different genes (digenic heterozygosity), and the presence of non-synonymous single-nucleotide polymorphism (28, 29). All such conditions converge in this Spanish family. The proband and sister II:6 present digenic heterozygosity (the *KCNH2* frameshift and the *TBX20* mutations), whereas sister II:1 presents a compound heterozygosity (the frameshift and the variant in *KCNH2*). Interestingly, nephew III:2, who has seizures, carries the benign p.Q1068R hERG variant and the *TBX20* mutation.

We are aware of the potential limitations of this study, including that a better experimental approach would have been to analyze in hiPSC-CMs the effects produced by WT and mutated *Tbx20* over all of the cardiac currents responsible for the AP morphology. It would have been even better to analyze the effects produced by *Tbx20* over cardiomyocytes differentiated from hiPSCs derived from each family member. The latter would have allowed directly testing the impact of the variants (and their connection) in a constant genetic background, weighting their respective involvement in the phenotypic expression of the LQTS. Despite such a limitation, the results strongly suggest that *TBX20* is a potential LQTS modifier gene because WT *Tbx20* increases hERG channel expression. The data show also that some mutations, such as p.R311C, can disable *Tbx20* protranscriptional activity over the *KCNH2* gene. Therefore, the putative effects of *Tbx20* variants on penetrance, expressivity, and outcome among LQTS patients merit further analysis.

Methods

Clinical Evaluation. Patients were evaluated by the Arrhythmia Unit of the Hospital Universitario La Paz. The study was approved by the Investigation Committee of the hospital and conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Each participant gave written informed consent.

DNA Sequencing. Genomic DNA was sequenced by means of a HaloPlex custom panel including coding regions and untranslated boundaries of the 82 genes listed in Table S1. Sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine was carried out at NIMGenetics. Variants identified in *KCNH2*, *TBX20*, and *KCNN3* were confirmed by the Sanger method.

Cell Culture and Transfection. HL-1 and Chinese hamster ovary cells were transiently transfected by using Lipofectamine 2000 and FuGENE X-tremeGENE, respectively, and cultured as described (15, 17, 18, 30).

Rat Ventricular Myocyte Isolation. Animal studies were approved by the Committee on the Use and Care of Animals at Complutense University and conformed to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. Single ventricular myocytes isolated from male Sprague–Dawley rats by enzymatic dissociation (17) were infected with lentiviral constructs encoding for human *Tbx20* WT or p.R311C.

Patch Clamping. Currents were recorded using the whole-cell patch-clamp technique (15, 17, 18, 30). Series resistance was compensated manually using the compensation unit of the Axopatch amplifier; $\geq 80\%$ compensation was achieved. No significant voltage errors (< 5 mV) due to series resistance were expected with the micropipettes used.

I_{Kr} , I_{CaL} , and AP Recordings in hiPSC-CMs. Enriched and mature DF19-9-11T hiPSC-CMs were generated as described elsewhere (13) and infected with the lentiviral constructs coding WT or p.R311C *Tbx20*. Currents were recorded at 21 to 23 °C, and APs were recorded at 35 °C using the whole-cell patch-clamp technique.

Western Blot Analysis. Cav1.2, Kir2.1, Kv7.1, minK, hERG, MiRP1, and *Tbx20* proteins were detected in HL-1 cells transfected or not with *Tbx20* WT or p.R311C by Western blot following previously described procedures (17, 18).

Luciferase Gene Expression Reporter Assay. Luciferase reporter assays were conducted in HL-1 cells transfected with pLightSwitch_Prom luciferase expression

reporter vectors carrying the minimal promoters of human *SCN5A*, *SCN2B*, *CACNA1C*, *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNH2*, or *KCNB3* (15, 18).

Tbx20 Silencing. For analysis of Tbx20 silencing, HL-1 cells were infected with lentivirus-encoding shRNA Tbx20 or scrambled shRNA (17).

Statistical Analysis. Results are expressed as mean \pm SEM. Unpaired *t* test or one-way ANOVA followed by Newman–Keuls test was used where appropriate. In small-size samples ($n < 15$), statistical significance was confirmed by using nonparametric tests. Comparisons between categorical variables were done using *Z* test. To take into account repeated sample assessments, data

were analyzed with multilevel mixed-effects models. A value of $P < 0.05$ was considered significant. Additional details are presented in *SI Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Paloma Vaquero, Sandra Sacristán, Lorena Ondo, and Ainara Albadalejo for their invaluable technical assistance. This work was supported by grants from Comunidad Autónoma de Madrid (S2010/BMD-2374: ITACA); Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2014-58769-P); Instituto de Salud Carlos III (PI16/00398, CB16/11/00303, and CB16/11/00504); ERA-Net for Research on Rare Diseases (AC14/00029); Mutua Madrileña and BBVA Foundations; National Heart, Lung, and Blood Institute of the US National Institutes of Health (R01-HL122352 to J.J.); and Leducq Foundation (to J.J.).

- Nakano Y, Shimizu W (2016) Genetics of long-QT syndrome. *J Hum Genet* 61(1):51–55.
- Havakuk O, Viskin S (2016) A tale of 2 diseases: The history of long-QT syndrome and Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 67(1):100–108.
- Keating MT, Sanguinetti MC (2001) Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 104(4):569–580.
- Sakabe NJ, et al. (2012) Dual transcriptional activator and repressor roles of TBX20 regulate adult cardiac structure and function. *Hum Mol Genet* 21(10):2194–2204.
- Qian L, et al. (2008) Transcription factor neuromancer/TBX20 is required for cardiac function in *Drosophila* with implications for human heart disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(50):19833–19838.
- Shen T, et al. (2011) Tbx20 regulates a genetic program essential to adult mouse cardiomyocyte function. *J Clin Invest* 121(12):4640–4654.
- Kapa S, et al. (2009) Genetic testing for long-QT syndrome: Distinguishing pathogenic mutations from benign variants. *Circulation* 120(18):1752–1760.
- Anson BD, et al. (2004) Molecular and functional characterization of common polymorphisms in HERG (KCNH2) potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(6):H2434–H2441.
- Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC (1996) Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. *J Gen Physiol* 107(5):611–619.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E (2004) Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 62(1):9–33.
- Amorós I, et al. (2011) Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm* 8(3):463–470.
- Nerbonne JM (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K^+ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 525(Pt 2):285–298.
- Herron TJ, et al. (2016) Extracellular matrix-mediated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiac monolayer structure and electrophysiological function. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 9(4):e003638.
- Plant LD, Xiong D, Dai H, Goldstein SA (2014) Individual I_{Ks} channels at the surface of mammalian cells contain two KCNE1 accessory subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(14):E1438–E1446.
- Barana A, et al. (2014) Chronic atrial fibrillation increases microRNA-21 in human atrial myocytes decreasing L-type calcium current. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 7(5):861–868.
- Luo X, et al. (2008) Genomic structure, transcriptional control, and tissue distribution of HERG1 and KCNQ1 genes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(3):H1371–H1380.
- Matamoros M, et al. (2016) Nav1.5 N-terminal domain binding to α 1-syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovasc Res* 110(2):279–290.
- Pérez-Hernández M, et al. (2016) Pitx2c increases in atrial myocytes from chronic atrial fibrillation patients enhancing I_{Ks} and decreasing $I_{Ca,L}$. *Cardiovasc Res* 109(3):431–441.
- Adelman JP, Maylie J, Sah P (2012) Small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels: Form and function. *Annu Rev Physiol* 74:245–269.
- Nagy N, et al. (2009) Does small-conductance calcium-activated potassium channel contribute to cardiac repolarization? *J Mol Cell Cardiol* 47(5):656–663.
- Johnson JN, et al. (2009) Identification of a possible pathogenic link between congenital long QT syndrome and epilepsy. *Neurology* 72(3):224–231.
- Khositseth A, Tester DJ, Will ML, Bell CM, Ackerman MJ (2004) Identification of a common genetic substrate underlying postpartum cardiac events in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm* 1(1):60–64.
- Kirk EP, et al. (2007) Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 81(2):280–291.
- Sanguinetti MC, et al. (1996) Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac $I(Ks)$ potassium channel. *Nature* 384(6604):80–83.
- Sesti F, Goldstein SA (1998) Single-channel characteristics of wild-type I_{Ks} channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J Gen Physiol* 112(6):651–663.
- Xu X, et al. (2009) MinK-dependent internalization of the I_{Ks} potassium channel. *Cardiovasc Res* 82(3):430–438.
- Stennard FA, Harvey RP (2005) T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development* 132(22):4897–4910.
- Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ (1999) Low penetrance in the long-QT syndrome: Clinical impact. *Circulation* 99(4):529–533.
- Napolitano C, Novelli V, Francis MD, Priori SG (2015) Genetic modulators of the phenotype in the long QT syndrome: State of the art and clinical impact. *Curr Opin Genet Dev* 33(1):17–24.
- Caballero R, et al. (2010) Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(35):15631–15636.
- Tuteja D, et al. (2010) Cardiac small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C termini of the channels. *Circ Res* 107(7):851–859.
- González de la Fuente M, et al. (2013) Chronic atrial fibrillation up-regulates β 1-adrenoceptors affecting repolarizing currents and action potential duration. *Cardiovasc Res* 97(2):379–388.
- Shimizu W, et al. (2003) Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long-QT syndrome. *J Am Coll Cardiol* 41(4):633–642.

Supporting Information

Caballero et al. 10.1073/pnas.1612383114

SI Methods

Clinical Evaluation. The proband and his relatives were evaluated by the Arrhythmia Unit of the Hospital Universitario La Paz. A complete clinical evaluation, including electrocardiogram (ECG), transthoracic echocardiogram, and exercise test, was performed for each. The study was approved by the Investigation Committee of the Hospital Universitario La Paz and conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Each participant gave written informed consent.

Custom Sequencing Panel. We selected the 82 genes listed in Table S1. In addition to genes already associated with primary arrhythmogenic syndromes, we included other genes encoding (*i*) constitutive proteins of cardiac ion channels, (*ii*) proteins that participate in cardiac channelosomes, and (*iii*) proteins whose involvement in the modulation of ion-channel activity has been demonstrated (functional studies) or suggested (genome-wide association studies). Most of the genes associated with inherited structural cardiomyopathy diseases were excluded. Genes underlying catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia were also excluded, because patients with this condition were not genotyped. A HaloPlex custom panel (216,105 kb) was designed using SureDesign (Agilent Technologies) and comprised the coding regions and untranslated boundaries (5' and 3' UTRs and 10-bp extensions from the 5' and 3' ends) of the 82 genes selected. The coordinates of the sequence data are based on the hg19 GRCh37 human genome reference.

Sample Preparation. Genomic DNA was extracted from whole blood by using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. DNA quantity and quality were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer and Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Library construction, quantification, template preparation, and sequencing were carried out at NIMGenetics. The DNA libraries were generated following the HaloPlex HS target enrichment protocol, starting from 3 μ g of genomic DNA. Enriched libraries were quantified by microfluidic analysis using the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) and templated by an emulsion PCR (OneTouch 2; Life Technologies) over Ion Sphere particles. Finally, DNA libraries were sequenced on an Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies).

Bioinformatics. Signal processing, base calling, alignment, and variant calling were performed on a PGM Torrent Server using Torrent Suite software version 3.6.2 and the Genome Analysis Toolkit (GATK).

Variants were annotated using Ion Reporter software. Variant filtering and prioritization were performed with an in-house software program and a local database. For each genetic variation identified, minor allelic frequency was consulted in the Exome Variant Server (evs.gs.washington.edu/EVS/) and 1000 Genomes database (www.internationalgenome.org/). In addition, the Human Gene Mutation Database (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php) was also consulted to identify pathogenic mutations previously reported. To predict pathogenicity, all variants were subjected to in silico analysis including prediction programs such as SIFT (sift.jcvi.org), PolyPhen-2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2), and PROVEAN (provean.jcvi.org/index.php). Alamut software was used for splicing prediction (www.interactive-bioinformatics.com). Candidate variants were visualized using the Integrative Genomics Viewer (software.broadinstitute.org/software/igv).

Sanger Sequencing. Variants found in the proband and sister II:1 were confirmed by Sanger and identified in their relatives by the same method (11). PCR products were purified using the illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare Life Sciences), and the analysis was performed by direct sequencing using the Applied Biosystems ABI Prism 3730 DNA sequencer (Secugen). The results were compared with the reference sequence from hg19 by means of Chromas Lite software (chromas.software.informer.com/2.4/).

Site-Directed Mutagenesis. Human *TBX20* cDNA subcloned in pCMV6-AC-GFP and the minimal promoter of human *KCNN3* (WT and with the A-to-G substitution at -66 bp to the ATG) were purchased from OriGene and Active Motif, respectively. The p.R311C mutation in *TBX20* and p.T152HfsX180 mutation in *KCNH2* were introduced using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) as previously described (11, 17, 30). The mutations were confirmed by direct DNA sequencing.

Cell Culture and Transfection. HL-1 cells were cultured in 60-mm gelatin/fibronectin-coated dishes at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂/95% O₂, with a humidity of ~95%, as previously described (15, 18). HL-1 cells were transfected with p.T152HfsX180 *KCNH2* (0.5 or 1 μ g) or with Tbx20 WT or p.R311C (2 μ g) by using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (15, 18). Forty-eight hours after transfection, cells were removed from the dish with a trypsin (1%) treatment (37 °C for 5 min). Chinese hamster ovary (CHO) cells were cultured as previously described and transiently transfected with the cDNA encoding WT and p.T152HfsX180 *KCNH2* (0.5 to 1 μ g) or *KCNN3* channels (1.6 μ g) plus the cDNA encoding the CD8 antigen (0.5 μ g) by using FuGENE X-tremeGENE (Roche Diagnostics) following the manufacturer's instructions (11, 15, 17, 18, 30). Forty-eight hours after transfection, cells were incubated with polystyrene microbeads precoated with anti-CD8 antibody (Dynabeads M-450; Life Technologies). Most of the cells that were beaded also had channel expression. To minimize the influence of the expression variability of transiently transfected mammalian cell lines, each construct was tested in a large number of cells obtained from at least three different transfection batches.

Rat Ventricular Myocyte Isolation. Single ventricular myocytes were isolated from hearts of three male Sprague-Dawley rats (225–250 g) by enzymatic dissociation with collagenase type II (Worthington) following previously described methods (17, 30). Procedures conformed with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. In addition, the study was approved by the University Committee on the Use and Care of Animals at Complutense University. Rats were heparinized (1,000 U/kg i.p.) and anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.). Isolated myocytes were seeded on laminin-coated glass coverslips and infected with lentiviral constructs (in pLenti-C-mGFP vector; OriGene) encoding for human Tbx20 WT or p.R311C 2 h after plating (17). A multiplicity of infection (MOI) of 40 and 70 was used for Tbx20 WT and Tbx20 p.R311C, respectively. The same stock of lentivirus was used for all of the experiments. In all cases, currents were recorded 48 h after the infection, and infected myocytes were identified by GFP fluorescence under fluorescence microscopy (Eclipse TE2000S; Nikon).

Patch Clamping. Currents were recorded at room temperature (21 to 23 °C) using the whole-cell patch-clamp technique using an Axopatch 200B patch-clamp amplifier (Molecular Devices) (11, 15, 17,

18, 30). Recording pipettes were pulled from 1.0-mm o.d. borosilicate capillary tubes (GD1; Narishige) using a programmable patch micropipette puller (P-2000 Flaming/Brown; Sutter Instruments) and heat-polished with a microforge (MF-83; Narishige). Micropipette resistance was kept below 3.5 M Ω when filled with the internal solution and immersed in the external solution. In all of the experiments, series resistance was compensated manually by using the series resistance compensation unit of the Axopatch amplifier, and $\geq 80\%$ compensation was achieved. Uncompensated access resistance and cell capacitance were 1.7 ± 0.8 M Ω and 62.1 ± 8.1 pF ($n = 75$), 1.5 ± 0.6 M Ω and 12.2 ± 1.0 pF ($n = 55$), and 2.0 ± 0.9 M Ω and 122.0 ± 6.0 pF ($n = 33$) in HL-1, CHO, and rat ventricular myocardial cells, respectively. Under our experimental conditions, no significant voltage errors (<5 mV) due to series resistance were expected with the micropipettes used.

To record hERG currents (I_{hERG}), CHO cells were perfused with an external solution containing 136 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Hepes, and 10 mmol/L glucose (pH 7.4 with NaOH). Recording pipettes were filled with an internal solution containing 80 mmol/L K-aspartate, 42 mmol/L KCl, 10 mmol/L KH₂PO₄, 5 mmol/L MgATP, 3 mmol/L phosphocreatine, 5 mmol/L Hepes, and 5 mmol/L EGTA (pH 7.2 with KOH). To record KCNN3 currents (I_{KCNN3}), CHO cells were perfused with an external solution containing 136 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 1.8 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Hepes, and 10 mmol/L glucose (pH 7.4 with NaOH). Recording pipettes were filled with an internal solution containing 130 mmol/L KCl, 1.08 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Hepes, 10 mmol/L EGTA, and 8.751 mmol/L CaCl₂, yielding a free (unchelated) [Ca²⁺] of 1 $\mu\text{mol/L}$ (pH 7.2 with KOH) (19, 20, 31).

To record I_{Na} in HL-1 cells, the external solution contained (17) 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L CsCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L Hepes, 5 mmol/L glucose, and 1 $\mu\text{mol/L}$ nifedipine (pH 7.35 with CsOH). Recording pipettes were filled with an internal solution containing 10 mmol/L NaF, 110 mmol/L CsF, 20 mmol/L CsCl, 10 mmol/L Hepes, and 10 mmol/L EGTA (pH 7.35 with CsOH). To record I_{CaL} in HL-1 cells, Ba²⁺ was used as a charge carrier (I_{Ba}) (15, 18). In these experiments, the external solution contained 137 mmol/L *N*-methyl-D-glucamin, 12 mmol/L CsCl, 20 mmol/L BaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Hepes, and 10 mmol/L glucose (pH 7.4 with HCl), whereas the internal solution contained 125 mmol/L CsCl, 20 mmol/L tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 5 mmol/L MgATP, 3.6 mmol/L phosphocreatine, 10 mmol/L Hepes, and 10 mmol/L EGTA (pH 7.2 with CsOH). To record I_{f} in HL-1 cells and I_{K1} in cultured adult rat ventricular myocytes, the external solution contained 120 mmol/L NaCl, 20 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Hepes, 2 mmol/L 4-aminopyridine, 10 mmol/L glucose, 1 $\mu\text{mol/L}$ nifedipine, 1 $\mu\text{mol/L}$ atropine, and 10 $\mu\text{mol/L}$ glibenclamide (pH 7.4 with NaOH). Recording pipettes were filled with an internal solution containing 80 mmol/L K-aspartate, 42 mmol/L KCl, 10 mmol/L KH₂PO₄, 5 mmol/L MgATP, 3 mmol/L phosphocreatine, 5 mmol/L Hepes, and 5 mmol/L EGTA (pH 7.2 with KOH). For I_{f} recordings, the external solution was supplemented with 100 $\mu\text{mol/L}$ BaCl₂.

To record outward K⁺ currents in HL-1 cells, the external solution contained (15, 18) 140 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Hepes, 10 mmol/L glucose, 2 mmol/L 4-aminopyridine, 1 $\mu\text{mol/L}$ nifedipine, and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ atropine (pH 7.4 with NaOH). The internal solution contained 80 mmol/L K-aspartate, 42 mmol/L KCl, 10 mmol/L KH₂PO₄, 5 mmol/L MgATP, 3 mmol/L phosphocreatine, 5 mmol/L Hepes, and 5 mmol/L EGTA (pH 7.2 with KOH).

To record I_{K1} in cultured rat ventricular myocytes, the external solution contained (17) 120 mmol/L NaCl, 20 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Hepes, 2 mmol/L 4-aminopyridine, 10 mmol/L glucose, 1 $\mu\text{mol/L}$ nifedipine, 1 $\mu\text{mol/L}$ atropine, and 10 $\mu\text{mol/L}$ glibenclamide (pH 7.4 with NaOH). Recording pipettes were filled with an internal solution containing

80 mmol/L K-aspartate, 42 mmol/L KCl, 10 mmol/L KH₂PO₄, 5 mmol/L MgATP, 3 mmol/L phosphocreatine, 5 mmol/L Hepes, and 5 mmol/L EGTA (pH 7.2 with KOH).

I_{hERG} was recorded by applying 5-s pulses in 10-mV increments from a holding potential of -80 mV to potentials between -80 and $+60$ mV (11, 18). Between -80 and -40 mV, only passive linear leak was observed, and least-squares fits to these data were used for passive leak correction. Current-voltage curves were constructed by plotting the current amplitude measured at the end of the depolarizing pulses as a function of membrane potential. Deactivating tail currents were recorded at -60 mV, and the activation curves were constructed by plotting peak tail current amplitudes as a function of the voltage of the preceding pulse. I_{KCNN3} was recorded by applying a human ventricular endocardial action-potential (AP) waveform (19, 20, 31). I_{Na} was recorded by applying 20-ms pulses in 5-mV increments from a holding potential of -120 mV to potentials ranging between -90 and $+30$ mV (17). Inactivation curves were recorded by applying 500-ms pulses from -120 mV to potentials between -130 and -30 mV in 5-mV increments followed by a test pulse to -20 mV. Availability curves were constructed by plotting the current amplitude recorded with the test pulse at -20 mV as a function of the membrane potential of the preceding pulse. To record persistent I_{Na} (I_{NaL}), 500-ms pulses from -120 to -20 mV were applied.

To obtain current-voltage relationships for I_{Ba} , 500-ms pulses in 10-mV increments from -30 mV to potentials between -40 and $+70$ mV were applied (15, 18). Activation curves for I_{Ba} were constructed by plotting the normalized conductance as a function of the membrane potential. To obtain the inactivation curves for I_{Ba} , a two-step protocol was used consisting of a first 500-ms conditioning pulse from -30 mV to potentials between -50 and $+20$ mV, followed by a 500-ms test pulse to $+20$ mV. Inactivation curves were constructed by plotting the current amplitude obtained with the test pulse normalized to the largest current, as a function of the voltage command of the conditioning pulse. To record I_{f} in HL-1 cells, 2-s pulses from -30 to potentials between -150 and 0 mV in 10-mV steps were applied.

In HL-1 cells, I_{Kr} was recorded by applying 5-s pulses from -80 to potentials between -80 and $+60$ mV, followed by repolarizing pulses to -60 mV to record the tail currents (18). After control recordings were obtained, cells were perfused with dofetilide (1 $\mu\text{mol/L}$) (10) and currents in the presence of dofetilide were subtracted from the control currents. Therefore, I_{Kr} was measured as the dofetilide-sensitive current. Activation curves for I_{Kr} were constructed by plotting the peak density of tail currents recorded at -60 mV, as a function of the voltage of the preceding pulse. Dofetilide-resistant current (I_{Ks}) was recorded by applying 5-s pulses from -80 to potentials ranging between -80 and $+60$ mV, followed by repolarizing pulses to -30 mV to record the tail currents (18). Voltage-dependent I_{Ks} activation was assessed by constructing conductance-voltage curves plotting the normalized conductance as a function of the membrane potential.

The protocol to record rat ventricular I_{K1} consisted of 250-ms steps that were imposed in 10-mV increments from -40 mV to potentials ranging between -100 and $+30$ mV (17, 30).

A Boltzmann function was fitted to activation/conductance-voltage and inactivation curves to obtain the midpoint (V_{h}) and slope (k) values of the conductance. In each experiment, current amplitudes were normalized to membrane capacitance to obtain current densities.

In another group of experiments, HL-1 cells were infected with two lentiviral constructs encoding for mouse Tbx20 (NM_194263)-silencing shRNA (A: 5'-GCCAATGCCTTCTCCATCGCCGCGCT-TAT-3'; B: 5'-GGAGTGGATCCTGAGTCCAAGTATATAGT-3') together with GFP or with a scrambled shRNA (OriGene). Lentivirus-encoding shRNA constructs were amplified, purified, and titered using previously described protocols (17). For Tbx20 silencing, an MOI of 15 and 80 was used for shRNA Tbx20 and

scrambled lentiviral constructs, respectively. Silencing of Tbx20 expression was confirmed by Western blot analysis following the procedures described below. The same stock of shRNA Tbx20 constructs and scrambled shRNA was used for all of the experiments. In all cases, currents were recorded 48 h after the infection; infected cells were identified by GFP fluorescence under fluorescence microscopy (Eclipse TE2000S; Nikon).

Currents and Action Potential Recordings in hiPSC-Derived Cardiomyocytes.

The DF19-9-11T human induced pluripotent stem cell (hiPSC) line was derived from foreskin fibroblasts without integration of vector and transgene sequences (13). DF19-9-11T hiPSCs were plated on Matrigel-coated (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; BD Biosciences) transparent polydimethylsiloxane membranes for cardiac-directed differentiation as previously described (13). Differentiation medium (EB-20) consisted of 80% (vol/vol) DMEM/F12, 0.1 mmol/L β -mercaptoethanol, 20% (vol/vol) FBS, and 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ blebbistatin (13). Once differentiated, cells were dissociated from the culture using gentle mechanical agitation and seeded on laminin-coated glass coverslips and infected with the lentiviral constructs encoding Tbx20 WT or Tbx20 p.R311C (MOI 40 and 70, respectively). In each case, the same stock of lentivirus was used for all of the experiments. Currents and action potentials were recorded 48 h after the infection; infected myocytes were identified by GFP fluorescence under fluorescence microscopy (Eclipse TE2000S; Nikon). Ion currents and action potentials were recorded at room temperature (21 to 23 $^{\circ}\text{C}$) and at 35 $^{\circ}\text{C}$, respectively, using the whole-cell patch-clamp technique and a Multi-Clamp 700B amplifier (Molecular Devices). Recording pipettes were pulled using a programmable patch micropipette puller (P-97 Flaming/Brown; Sutter Instruments) and heat-polished with a microforge (MF-83; Narishige). Micropipette resistance was kept below 3.5 M Ω for current recordings or between 4 and 6 M Ω for action-potential recordings. In all experiments, series resistance and cell capacitance were compensated automatically. The external solution for I_{Kr} recordings contained (6, 8, 10) 140 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl_2 , 15 mmol/L Hepes, 5 mmol/L 4-aminopyridine, 5 mmol/L glucose, 0.2 mmol/L CdCl_2 , 0.5 mmol/L BaCl_2 , and 1.8 mmol/L CaCl_2 (pH 7.4 with NaOH). Recording pipettes were filled with an internal solution containing 150 mmol/L KCl, 4.46 mmol/L K_2ATP , 5 mmol/L phosphocreatine, 5 mmol/L Hepes, 5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl_2 , and 2 mmol/L β -hydroxybutyric acid (pH 7.2 with KOH). The external solution for I_{CaL} recordings contained 137 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L CsCl, 1.25 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L Hepes, 1.2 mmol/L CaCl_2 , and 5.5 mmol/L glucose (pH 7.35 with NaOH). Recording pipettes were filled with an internal solution containing 120 mmol/L CsCl, 20 mmol/L TEA-Cl, 1 mmol/L MgCl_2 , 5.2 mmol/L MgATP , 10 mmol/L Hepes, and 10 mmol/L EGTA (pH 7.2 with CsOH).

The protocol to record I_{Kr} consisted of 3-s pulses from -60 mV to potentials between -40 and $+60$ mV in 10-mV increments, followed by a repolarizing pulse to -60 mV to record tail currents (11, 18). I_{Kr} was measured as current sensitive to dofetilide (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$). To record I_{CaL} , 200-ms pulses from -50 to $+60$ mV in 10-mV steps were applied (15, 18). A 50-ms prepulse from -80 to -30 mV was applied before each test pulse to activate and inactivate I_{Na} .

To record action potentials, the external solution contained (13, 32) 148 mmol/L NaCl, 0.4 mmol/L NaH_2PO_4 , 1 mmol/L MgCl_2 , 5.5 mmol/L glucose, 5.4 mmol/L KCl, 15 mmol/L Hepes, and 1 mmol/L CaCl_2 (pH 7.4 with NaOH), whereas the internal solution contained 150 mmol/L KCl, 4.46 mmol/L K_2ATP , 5 mmol/L phosphocreatine, 5 mmol/L Hepes, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L MgCl_2 , and 2 mmol/L β -hydroxybutyric acid (pH 7.2 with KOH). Cells were stimulated at 0.1 to 2 Hz in current-clamp configuration, using square wave pulses (amplitude 30 to 50 pA; duration 4 ms) generated by a DS8000 digital stimulator (World Precision Instruments).

Western Blot Analysis. Detection of Cav1.2, Kir2.1, Kv7.1, minK, hERG, and MiRP1 proteins was carried out in HL-1 cells transfected or not with Tbx20 WT or p.R311C by Western blot following previously described procedures (15, 17, 18, 30). HL-1 cells were collected in RIPA buffer containing 50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, and protease inhibitor mixture (Sigma). Nuclei and cell debris were removed by centrifugation at $9,164 \times g$ for 20 min at 4 $^{\circ}\text{C}$. The total protein amount of the extracts was calculated with the bicinchoninic acid method (Pierce). Afterward, samples were run on 10% Mini-PROTEAN TGX stain-free gels (Bio-Rad) and transferred to nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites were blocked with 5% nonfat dried milk in PBS with Tween 20 (0.05%) for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated with anti-Cav1.2 (1:1,000; clone L57/46; NeuroMab), anti-Kir2.1 (1:500; Alomone), anti-Kv7.1 (1:250; Sigma), anti-minK (1:250; Abcam), anti-hERG (1:3,000; Alomone), anti-MiRP1 (1:600; Sigma), and anti-Tbx20 (1:200; Abcam) antibodies overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$ and then for 1 h with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1:10,000; Jackson ImmunoResearch). Membranes were washed three times with PBS/Tween after adding the primary and secondary antibodies. Protein expression was detected by chemiluminescence (ECL; GE Healthcare) and visualized using the ChemiDoc MP System and Image Lab 5.2.1 software (Bio-Rad). As loading control, the total protein was used by means of stain-free gels (Bio-Rad) and Image Lab software (15, 17, 18, 30). Expression of the proteins in the immunoblot was then normalized to total protein.

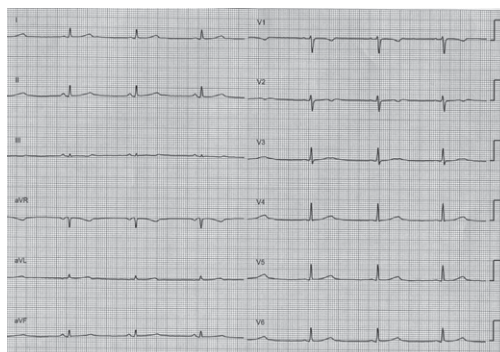
Luciferase Gene Expression Reporter Assay. For luciferase reporter assays (15, 18), HL-1 cells were seeded in 96-well plates and cultured as mentioned above. Cells were transfected with pLightSwitch_Prom luciferase expression reporter vectors (Active Motif) carrying the minimal promoters of human *SCN5A*, *SCN2B*, *CACNA1C*, *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNH2*, or *KCNN3* (WT or mutated). In these experiments, cells were cotransfected with 100 ng of an empty vector, Tbx20 WT, or p.R311C. The effects of the cotransfection of Tbx20 WT and p.R311C (100 ng each) in cells expressing the pLightSwitch_Prom luciferase expression reporter vector carrying the *KCNH2* promoter were also determined. In some experiments, SP1 was used as positive control. Forty-eight hours after transfection, luciferase assays were conducted using the LightSwitch Luciferase Assay Reagent (Active Motif) and a Berthold luminometer (15, 18). Luciferase activity was normalized to sample protein concentration. All reporter assays were performed in triplicate.

Mathematical Modeling of Ventricular Action Potential. For simulating the shapes of ventricular action potentials, we used the Grandi-Bers model of a human ventricular AP previously validated and used for similar purposes (11, 32). Simulated APs were implemented with MATLAB 6.5 (MathWorks) using the ode15s integration algorithm. Epicardial and endocardial model cells were paced at different frequencies ranging from 0.1 to 3 Hz, and currents and ionic concentrations were allowed to stabilize for at least 200 cycles. Under these conditions the model was stable.

The model was run under basal conditions and by incorporating the specific changes in conductance, time constants, and activation/inactivation curves demonstrated in the functional analyses of p.T152HfsX180 *KCNH2* and p.R311C Tbx20 mutations.

Statistical Analysis. Results are expressed as mean \pm SEM. Unpaired *t* test or one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test was used where appropriate. In small-size samples ($n < 15$), statistical significance was confirmed by using nonparametric tests. Comparisons between categorical variables were done using Z test. To take into account repeated sample assessments, data were analyzed with multilevel mixed-effects models. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

II:6 (basal ECG)



II:6 (after adrenaline)

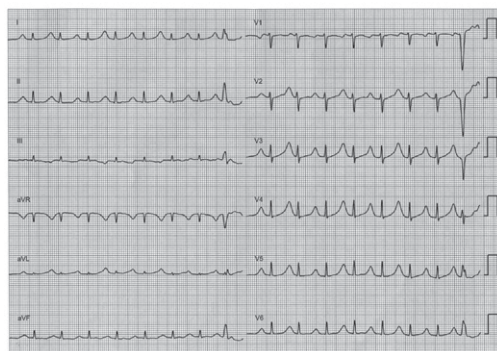


Fig. S1. Twelve lead ECGs of sister II:6 under basal conditions (*Top*) and after adrenaline bolus injection (*Bottom*) (paper speed 25 mm/s). Basal ECG shows normal PR (140 ms), QRS (90 ms), sinus bradycardia (48 bpm), and low-voltage wide QT waves (QTc 460 ms). As shown, the adrenaline test was positive, because QTc was prolonged to 618 ms, the amplitude of the T waves exhibited alternance, and polymorphic ventricular extrasystoles were developed. Adrenaline tests were developed in all relatives following the protocol described by Shimizu et al. (33).



Caballero et al. www.pnas.org/cgi/content/short/1612383114



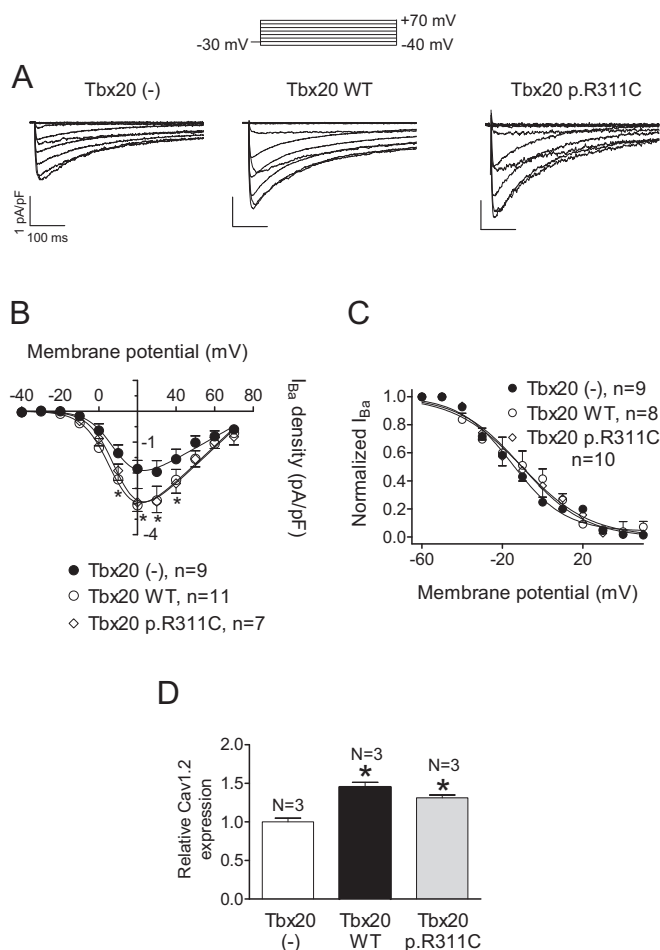
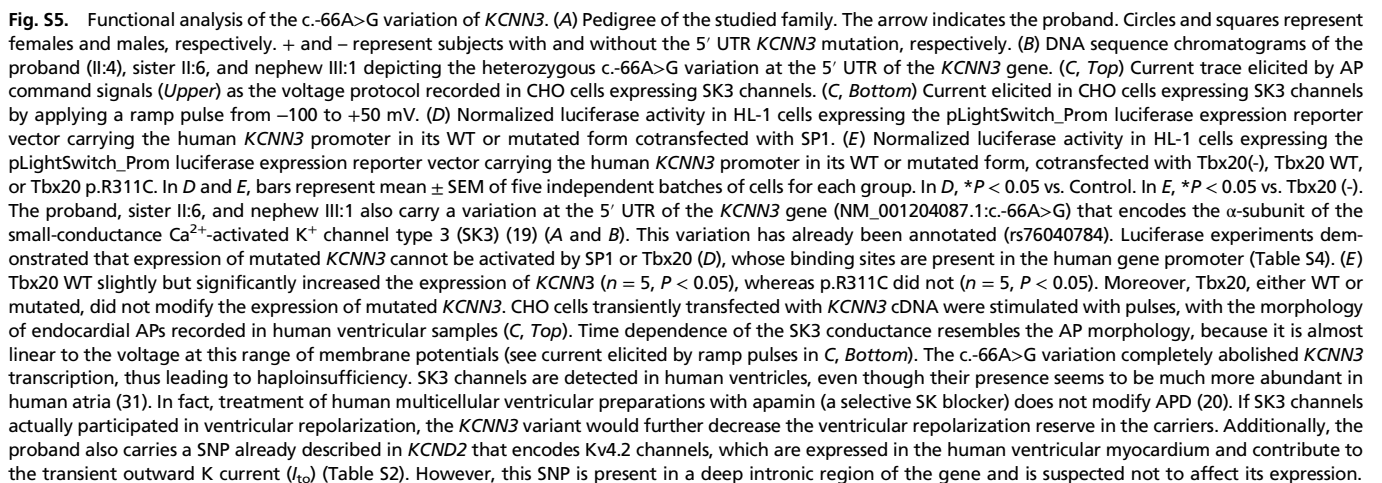


Fig. S4. (A) I_{Ba} traces recorded in HL-1 cells transfected or not with WT or p.R311C Tbx20 by applying the pulse protocol (Top). (B and C) Current density-voltage relationships (B) and steady-state inactivation (C) for I_{Ba} recorded in the three experimental groups. (D) Mean densitometric analysis of Cav1.2 levels normalized to total protein. Each point/bar represents the mean \pm SEM of n cells or N dishes of cells in each group. * $P < 0.05$ vs. Tbx20 (-). In these experiments, I_{CaL} was measured using Ba^{2+} as a charge carrier (15, 18). WT Tbx20 slightly but significantly increased the I_{Ba} density (A and B) ($n \geq 9$, $P < 0.05$). Moreover, p.R311C Tbx20 also increased the I_{Ba} density similar to Tbx20 WT ($n = 7$, $P > 0.05$ vs. Tbx20 WT). However, neither WT nor mutated Tbx20 affected the voltage dependence of activation or inactivation of the channel (C) (Table S3). Western blot analysis in HL-1 cells (D) (Fig. S3) demonstrated that both WT and p.R311C Tbx20 significantly and similarly increase Cav1.2 expression, consistent with the presence of the Tbx20 binding site in the mouse, but not the human, *CACNA1C* gene promoter (Table S4).



Caballero et al. www.pnas.org/cgi/content/short/1612383114

Table S1. Cont.

No.	Gene	Protein name	Location
63	PRKAG2	Protein kinase, AMP-activated, gamma 2 noncatalytic subunit	7q35-q36
64	PRKCA	Protein kinase C, alpha	17q22-q24
65	PRMT3	Protein arginine methyltransferase 3	11p15.1
66	PRMT5	Protein arginine methyltransferase 5	14q11.2
67	RANGRF	RAN guanine nucleotide release factor (MOG1)	17p13
68	SCN10A	Sodium channel, voltage-gated, type X, alpha subunit	3p22.2
69	SCN1B	Sodium channel, voltage-gated, type I, beta subunit	19q13.12
70	SCN2B	Sodium channel, voltage-gated, type II, beta subunit	11q22-qter
71	SCN3B	Sodium channel, voltage-gated, type III, beta subunit	11q24.1
72	SCN4B	Sodium channel, voltage-gated, type IV, beta subunit	11q23.3
73	SCN5A	Sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit	3p21
74	SCN8A	Sodium channel, voltage gated, type VIII, alpha subunit	12q13.1
75	SLMAP	Sarcolemma associated protein	3p21.2-p14.3
76	SNTA1	Syntrophin, alpha 1 (dystrophin-associated protein A1, 59 kDa, acidic component)	20q11.2
77	STRN	Striatin, calmodulin binding protein	2p22.2
78	TBX20	T box 20	7p14.3
79	TBX3	T box 3	12q24.1
80	TBX5	T box 5	12q24.1
81	TRPM4	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4	19q13.3
82	TRDN	Triadin	6q22.31

Table S2. Summary of all nonsynonymous variants identified in the proband

Gene	Genotype	Ancestral allele	Variant	dbSNP_ID	MAF	Frequency in African population	Amino acid substitution	Transcript	PROVEAN prediction	SIFT prediction
ACE	Heterozygous	A	G	rs12709426	0.0050	0.0550	D592G	NM_000789.3	Neutral	Tolerated
ACE	Heterozygous	T	C	rs4317	0.0180	0.2010	S32P	NM_152830.2	Neutral	Tolerated
ACE	Heterozygous	A	G	rs4318	0.0190	0.2064	S49G	NM_152830.2	Neutral	Tolerated
ANK2	Heterozygous	C	T	rs3733617	0.0900	0.3614	P2835S	NM_001148.4	Neutral	Tolerated
ANK2	Heterozygous	C	G	rs45570339	0.0008	0.0089	L3621V	NM_001148.4	Neutral	Tolerated
CACNB2	Heterozygous	G	C	rs149167651	0.0001	0.0012	V158L	NM_201590.2	Neutral	Tolerated
KCNB2	Heterozygous	A	G	rs16938507	0.0041	0.0470	E657G	NM_004770.2	Neutral	Tolerated
KCND2	Heterozygous	C	T	rs6975107	0.0097	0.1268	Intronic	NM_012281.2	Neutral	Damaging
KCNH2	Heterozygous	T	TG		0.0002	0.0011	T152HfsX180	NM_000238.3	Unknown	Unknown
KCNH2	Heterozygous	T	C	rs151031345	0.00004	0.0003	Q1068R	NM_000238.3	Deleterious	Damaging
KCNV3	Heterozygous	A	G	rs76040784	0.0120	0.1485	5' UTR (-66 bp to ATG)	NM_002249.5	Neutral	Damaging
TBX20	Heterozygous	G	A	rs199774220	0.0002	0.0001	R311C	NM_001077653.2	Deleterious	Damaging

Only nonsynonymous variants with a coverage >30 were included. MAF, minor allele frequency and frequency in the African population, as provided in [exac.broadinstitute.org](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/). Reference SNP numbers were obtained from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

Table S4. Presence of the Tbx20 binding site in human and mouse promoter sequences of genes encoding ion-channel subunits and transcription factors relevant to human cardiac repolarization

Gene	Human		Mouse	
	Transcript, accession no.	Tbx20 binding site in proximal promoter	Transcript, accession no.	Tbx20 binding site in proximal promoter
ABCC9	XM_005253288.2	No	NM_021042	No
CACNA1C	XM_011521022.1	No	NM_009781	−1884
CACNA1G	NM_001256325.1	No	NM_009783.3	No
CACNA1H	NM_021098.2	No	NM_021415.4	No
CACNA2D1	NM_000722.3	No	NM_009784	No
CACNB2	NM_201590.2	No	NM_023116	No
GATA4	NM_002052.3	No	NM_008092.3	No
GATA5	NM_080473.4	No	NM_008093.2	No
HCN1	NM_021072.3	No	NM_010408	No
HCN2	NM_00194.3	No	NM_008226	−2037
HCN3	NM_020897.2	No	NM_008227.1	No
HCN4	NM_005477.2	No	NM_001081192	No
IRX1	NM_024337.3	No	NM_010573.2	No
IRX4	NM_001278632.1	No	NM_018885.2	No
IRX5	NM_005853.5	No	NM_018826.2	No
KCNE1	NM_000219.5	−544	NM_008424.3	−865/−790
KCNE2	NM_172201.1	−467	NM_134110.3	No
KCNE3	NM_005472.4	No	NM_001190869.1	No
KCNH2	NM_000238.3	+161	NM_013569.2	+88
KCNJ11	NM_001166290.1	−678	NM_001204411.1	No
KCNJ12	NM_021012.4	No	NM_010603.6	−2546
KCNJ2	NM_000891.2	No	NM_008425	No
KCNJ3	NM_002239.3	No	NM_008426	No
KCNJ4	NM_152868.2	No	NM_008427.4	−1984
KCNJ5	NM_000890.3	No	NM_010605.4	−2721
KCNJ8	NM_004982.3	−572	NM_008428	−783
KCNN3	NM_002249.5	−550	NM_080466.2	−1259
KCNQ1	NM_000218.2	No	NM_008434	−1992/−2474
MEF2C	NM_001193350.1	No	NM_001170537.1	No
NKX2.5	NM_004387.3	No	NM_008700.2	No
SCN1B	NM_001037.4	No	NM_011322	No
SCN2B	NM_004588.4	−314	NM_001014761	−576
SCN3B	XM_011542897.1	No	NM_178227	−496
SCN4B	NM_001142348.1	No	NM_001013390	−2999/−1149
SCN5A	NM_001160161.1	No	NM_021544.4	No
TBX5	NM_181486.2	No	NM_011537.3	No
TBX20	NM_001077653.2	No	NM_194263.2	No

Mouse and human promoter sequences were obtained from epd.vital-it.ch and switchgeargenomics.com/products/promoter-reporter-collection, respectively. Human sequences include positions ~−800 to +200, whereas mouse sequences include positions ~−3000 to +200. Positions were numbered with respect to the transcription start site (+1). Rat *KCNJ2* promoter sequence (XM_006247567.2) does not exhibit the Tbx20 consensus binding site.